

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 065**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/EP2010/070076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073389**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10790452 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2513134**

54 Título: **Solución de lavado y método para cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

18.12.2009 US 288059 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.01.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FRAUENSCHUH, ACHIM y
BILL, KURT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 651 065 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Solución de lavado y método para cromatografía de afinidad

Antecedentes de la Invención

5 La cromatografía de afinidad permite la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de moléculas, tales como una recolección celular, con base en la unión preferencial de la proteína de interés a una diana en fase sólida, tal como una matriz en gel. Este componente en fase sólida se forma típicamente en una columna a través de la cual se aplica la mezcla que contiene la proteína de interés. En esta etapa inicial, llamada la etapa de captura, la proteína de interés se une específicamente a la diana en fase sólida mientras que otros componentes de la mezcla fluyen a través de la columna. Sin embargo, ciertos componentes dentro de la mezcla, incluyendo especies de alto peso molecular (HMW), especies de bajo peso molecular (LMW) y proteínas de la célula huésped (HCP), pueden permanecer dentro de la columna como impurezas junto con la proteína de interés. Así, típicamente se llevan a cabo una o más etapas de lavado en las cuales se aplican una o más soluciones de lavado a la columna para eliminar estas impurezas mientras que se mantiene la unión de la proteína de interés a la fase sólida. Finalmente, después de la eliminación de las impurezas por las etapas de lavado, la proteína de interés es recuperada de la columna mediante una etapa de elución, en la cual una solución de elución que rompe la unión de la proteína de interés a la diana en fase sólida, se aplica a la columna y la proteína de interés es recuperada en el eluido. De acuerdo con lo anterior, la efectividad de la cromatografía de afinidad en la purificación de una proteína de interés depende en gran parte de la identificación de las condiciones de lavado que permiten una eliminación eficiente de las impurezas (por ejemplo, HMW, LMW, HCP), a la vez que no rompe la unión de la proteína de interés a la diana en fase sólida, o que de otra manera tenga efectos indeseados.

Un tipo particularmente útil de cromatografía de afinidad es la cromatografía de Proteína A para la purificación de proteínas que contienen una región de inmunoglobulina Fc, tales como anticuerpos y proteínas de fusión Fc. Se han descrito diversas soluciones de lavado para la eliminación de impurezas de columnas de Proteína A, incluyendo soluciones de lavado que contienen uno de los siguientes: electrolitos hidrófobos (por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio, cloruro de tetrapropilamonio o cloruro de tetrabutilamonio a pH 5.0-7.0), solventes (por ejemplo, isopropanol o polipropileno/etilenglicol al 5-20%), urea (por ejemplo, a una concentración de 1-4 M), detergentes (por ejemplo, Tween 20 o Tween 80 al 0.1-1%), polímeros (por ejemplo, polietilenglicol al 5-15% tal como PEG400 o PEG8000) o soluciones reguladoras altamente concentradas tales como reguladores de Tris, HCL, acetato, sulfato, fosfato o citrato a una concentración de 0.8-2.0 M a un pH entre 5.0 y 7.0 (véase, por ejemplo, Shukla, A.A. and Hinckley, P. (2005) *Biotechnol. Prog.* 24:1115-1121; Patente de los Estados Unidos No. 6,127,526 y 6,333,398 de Blank; y Patente de los Estados Unidos No. 6,870,034 de Breece et al.). Muchos de estos agentes químicos, sin embargo, tienen una o más desventajas, incluyendo pero no limitándose a toxicidad, capacidad y corrosión, inflamabilidad, inestabilidad, desecho costoso o residuos nocivos y/o ineficiente eliminación de contaminantes durante la etapa de lavado.

35 Los reguladores de lavado para cromatografía de Proteína A contienen sal (tal como cloruro de sodio), solos o en combinación con un detergente (por ejemplo, Tween 20), un solvente (por ejemplo, hexilenglicol) o un polímero (por ejemplo, polietilenglicol), también han sido descritos (Patente de los Estados Unidos No. 6,870,034 de Breece et al.).

40 Barron et al. describen una solución de lavado intermedia para cromatografía de Proteína A que contiene de 0.5 a 2.0 M de arginina en un regulador de fosfato/acetato a pH 5.0-7.5 (de manera óptima regulador de arginina 1M, fosfato/acetato 0.1 M a pH 5,0). Se reporta que esta etapa de lavado con arginina elimina los contaminantes de HCP. Los autores también probaron una solución de lavado intermedia que contenía cloruro de sodio a 0.5-2.0 M a pH 5.0-7.5 pero informaron que el lavado con NaCl no mostró un descenso significativo en HCP (Barron et al., "Improving Purity on Protein A Affinity Media Through Use of an Arginina Intermediate Wash Step", <http://www.priorartdatabase.com/IPCOM/000127319>).

45 Sun et al. también describen el lavado de columnas de cromatografía por afinidad, tales como columna de Proteína A, con un regulador de lavado que contiene arginina, o un derivado de arginina, a una concentración de 0.1-2.0 M y a un pH de 4.5-8.0 (Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos No. 20080064860 y 20080064861; Publicación PCT WO 2008/031020).

50 La arginina también ha sido utilizada para eluir proteínas desde columnas de cromatografía de afinidad y otros tipos de columnas de purificación. Por ejemplo, Arakawa et al describe métodos para eludir anticuerpos de una columna de Proteína A utilizando un regulador de elución que contiene arginina 0.5-2.0 M a pH 4.1-5.0 (Arakawa et al. (2004) *Protein Expression and Purification* 36:244-248; Tsumoto, K. et al. (2004) *Biotechnol. Prog.* 20:1301-1308; Publicación de Patente No. 20050176109). Adicionalmente la Patente de los Estados Unidos No. 7,501,495 de Ejima et al describe métodos para eludir proteínas a partir de una columna de filtración por gel utilizando una solución de desarrollo que contiene clorhidrato de arginina. Ghose et al describe métodos para eludir proteínas de interés a partir de sílice no derivado utilizando un gradiente de arginina como eluyente (Ghose, S. et al. (2004) *Biotech. Bioeng.* 87:413-423). La Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20030050450 de Coffman et al describe métodos para disociar moléculas que contienen Fc de complejos de la molécula que contiene Fc y Proteína

A, en donde los complejos de Fc/Proteína A son aplicados a una columna de interacción hidrófoba (HIC) y la columna es lavada con un regulador que contiene arginina.

Resumen de la invención

5 Esta invención provee un método de lavado utilizando una solución de lavado eficiente y robusta para cromatografía de afinidad. Esta solución de lavado se aplica en una etapa de lavado previa a la etapa de elución, y su uso da como resultado altos rendimientos y altas concentraciones de la proteína de interés eluida de la matriz de afinidad a la vez que elimina efectivamente tanto especies de alto peso molecular (HMW) y proteínas la célula huésped (HCP) del material de partida aplicado a la matriz. Esta solución de lavado está caracterizada por la presencia tanto de arginina (o un derivado de arginina) y una sal no reguladora, tal como una sal de halógeno. Preferiblemente, la solución de lavado está a un pH alto, por encima de 8.0. Esta combinación de arginina (o un derivado de arginina) y una sal no reguladora elimina considerablemente más impurezas que las soluciones de lavado que contienen arginina o una sal sola y da como resultado un pico de elución más agudo que se correlaciona con una alta concentración de la proteína recuperada de interés.

15 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención provee un método para producir una proteína purificada de interés que es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión Fc, utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (AC) a la cual se une el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc sobre la matriz AC; y (b) lavar la matriz AC con una solución de lavado que comprende tanto (i) arginina, o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste de acetil arginina, N-alfa-butirolil-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina, a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M y (ii) una sal no reguladora a una concentración en un rango de 0.1-2.0 M, en el que la solución de lavado elimina impurezas de la matriz AC; y (c) eludir el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o la proteína de fusión Fc de la matriz AC; con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz AC es seleccionada del grupo consistente de una columna de Proteína A, una columna de Proteína G, una columna de Proteína A/G y una columna de Proteína L.

25 En una realización preferida, la matriz AC es una columna de Proteína A. En diversas otras realizaciones, la matriz AC puede ser seleccionada, por ejemplo, del grupo consistente de una columna de Proteína G, una columna de Proteína A/G, una columna de Proteína L, una columna para cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado (IMAC), una columna de resina calmodulina, una columna MEP HyperCel™, una columna que enlaza la proteína de unión a maltosa (MBP), una columna que enlaza glutationa-S-transferasa (GST) y una columna que enlaza Strep-Tag II. En una realización preferida, una proteína de interés es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la matriz AC, tal como una columna de Proteína A.

30 En una realización preferida, la una o más soluciones de lavado comprenden Arginina-HCl a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M, preferiblemente en un rango de 0.1-0.5 M. En realizaciones particulares, la arginina-HCl está presente a una concentración de 0.1 M o aproximadamente 0.1 M, 0.25 M o aproximadamente 0.25 M, o 0.5 M, o aproximadamente 0.5 M. En otras realizaciones, la una o más soluciones de lavado comprenden un derivado de arginina seleccionado del grupo consistente de acetil arginina, N-alfa-butirolil-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina. Preferiblemente, la arginina o derivado de arginina comprende L-arginina, aunque también se abarca D-arginina.

40 En una realización preferida, la sal no reguladora en la una o más soluciones de lavado es cloruro de sodio (NaCl), a una concentración en un rango de 0.1-2.0 M. En realizaciones particulares, el NaCl está presente en una concentración de 0.75 M o aproximadamente 0.75 M, 1.0 M o aproximadamente 1.0 M, o 1.25 M o aproximadamente 1.25 M. En otras realizaciones, la sal no reguladora en la una o más soluciones de lavado se selecciona del grupo consistente de cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio.

45 En una realización particular, el pH de la una o más soluciones de lavado es mayor de 8.0, preferiblemente al menos 8.1, más preferiblemente al menos 8.5 y aún más preferiblemente al menos 8.9. En una realización, el pH de la una o más soluciones de lavado está en un rango de 8.1-9.5. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado está en un rango de 8.5-9.5. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado es aproximadamente 9.0. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado es 9.0.

50 La combinación de arginina y sal de lavado no reguladora descrita aquí se aplica en una solución de lavado sencillo que contiene ambos componentes (esto es, la matriz AC es lavada con una solución de lavado que comprende tanto (i) arginina o un derivado de arginina; y (ii) (una sal no reguladora). Alternativamente, en otros métodos de lavado que no son cubiertos por las reivindicaciones pueden utilizarse dos soluciones de lavado, una que contiene arginina o un derivado de arginina (preferiblemente a un pH mayor de 8.0) y la otra que contiene una sal no reguladora, en lavados en tándem. De acuerdo con lo anterior, en tales métodos de lavado, la matriz AC es lavada en dos soluciones de lavado, una primera solución de lavado y una segunda solución de lavado. La primera solución de lavado puede comprender arginina, o un derivado de arginina, y la segunda solución de lavado puede comprender

una sal no reguladora. Alternativamente, la primera solución de lavado puede comprender una sal no reguladora y la segunda solución de lavado puede comprender arginina o un derivado de arginina.

El método de lavado de la invención es efectivo para retirar una variedad de impurezas, incluyendo especies de alto peso molecular (HMW) y proteína de célula huésped (HCP).

- 5 En otro aspecto, la invención provee un método para producir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo purificado, utilizando una columna de Proteína A, comprendiendo el método (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, sobre la columna de Proteína A; (b) lavar la columna de Proteína A con una solución de lavado que comprende (i) arginina-HCL, a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M (preferiblemente de 0.1-0.5 M), y cloruro de sodio, a una concentración en un rango de 0.1-2.0 M, en donde la
10 solución de lavado elimina impurezas de la columna de Proteína A; y (c) eludir el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la columna de Proteína A. En realizaciones particulares, la arginina-HCL está presente a una concentración de 0.1 M o aproximadamente 0.1 M, 0.25 M o aproximadamente 0.25 M, o 0.5 M o aproximadamente 0.5 M. En realizaciones particulares, el NaCl está presente a una concentración de 0.75 M o aproximadamente 0.75 M, 1.0 M o aproximadamente 1.0 M, o 1.25 M o aproximadamente 1.25 M. En diversas realizaciones, el pH de la
15 solución de lavado es mayor de 8.0, preferiblemente al menos 8.1, más preferiblemente al menos 8.5, más preferiblemente 9.0, en un rango de 8,1-9.5, o en un rango de 8.5-9.5.

Descripción Detallada de la Invención

- La invención divulga una nueva solución de lavado para cromatografía de afinidad, tal como una cromatografía de Proteína A, la cual se aplica a la columna antes de la elución de la proteína de interés para eliminar impurezas. La
20 nueva solución de lavado está compuesta de arginina, o un derivado de arginina y una sal no reguladora. Típicamente, la solución de lavado es una solución acuosa.

- Tal como se utiliza aquí, el término "sal no reguladora" se refiere a una sal que está presente en la solución de lavado que es de un tipo, y a una concentración, tales que no contribuye sustancialmente a mantener el pH de las
25 soluciones de lavado bajo las condiciones aplicadas (tales como pH altos) por adición de ácido o base. Típicamente, la sal no reguladora es una sal iónica. Las sales reguladoras incluyen sales de halógeno incluyendo aquellas que comprenden Cl o Br (más preferiblemente Cl), en particular sales de halógeno que comprenden metales alcalinos o metales alcalinotérreos, incluyendo Na, K, Ca y Mg (más preferiblemente Na o K). El término "sal no reguladora" no incluye sales reguladoras tales como acetato de sodio, fosfato de sodio y Tris, que contribuyen sustancialmente a
30 mantener el pH de una solución de lavado bajo las condiciones aplicadas. En una realización preferida, la sal no reguladora es una sal de halógeno (por ejemplo, que comprende Cl o Br). En otra realización, la sal no reguladora es una sal de halógeno que comprende sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca) o magnesio (Mg), más preferiblemente, sodio (Na) o potasio (K). En aún otra realización, la sal no reguladora es seleccionada del grupo consistente de NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂. En una realización particularmente preferida, la sal no reguladora es cloruro de sodio (NaCl). Típicamente, la sal no reguladora se utiliza a una concentración "alta" de al menos 1 M. Otras
35 concentraciones y rangos de concentración adecuados se describen adicionalmente más adelante.

- Esta nueva combinación de componentes de lavado elimina considerablemente más impurezas que los procedimientos utilizados comúnmente sin afectar la recuperación. Además, esta condición de lavado da como
40 resultado un pico de elución más agudo correlacionándose con una concentración más alta de la proteína de interés en el eluido, lo cual es ventajoso para incrementar el rendimiento de los procesos de purificación corriente abajo adicionales.

- La eliminación eficiente de impurezas, incluyendo proteínas de la célula huésped (HCP) e impurezas relacionadas con el producto tales como especies de alto peso molecular (HMW) y especies de bajo peso molecular (LMW), es un factor crucial durante el procesamiento corriente abajo de una proteína de interés. La cromatografía de afinidad se
45 utiliza frecuentemente como primera etapa de un proceso de purificación de etapas múltiples para una proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo) y la pureza de la proteína de interés después de la cromatografía de afinidad influye notablemente en la clase y número de etapas de purificación subsecuentes. Otro papel importante de la cromatografía de afinidad es concentrar el producto, lo cual permite el uso de columnas proporcionalmente más pequeñas, menos costosas en etapas de purificación subsecuentes. Por lo tanto, es particularmente importante optimizar la eliminación de impurezas durante la etapa de cromatografía de afinidad.

- 50 Condiciones de pH bajo, típicamente entre pH 3-4, son un requisito para eluir la proteína unida de interés desde la matriz de afinidad y tiene la desventaja de inducir potencialmente la agregación. Históricamente, se han utilizado condiciones menos restrictivas, tales como pH 5-5.5, para lavar impurezas enlazadas no específicamente desde la columna a la vez que se conserva la interacción entre la proteína de interés y la matriz de afinidad. La recuperación de la proteína de interés, sin embargo, disminuye frecuentemente debido a la elución parcial de una proteína de
55 interés a estas condiciones, especialmente cuando se trabaja a altas densidades de carga. De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la solución de lavado provista por la presente invención se ejecuta ventajosamente a un pH alto, mayor de 8.0, lo cual conserva el enlazamiento de la proteína de interés a la matriz de afinidad a la vez que permite la eliminación de impurezas.

- La nueva solución de lavado para cromatografía de afinidad divulgada por la presente invención está basada en una mezcla de arginina (o derivado de arginina) y una sal no reguladora, preferiblemente utilizada a un pH alto. La gran diversidad biofísica de impurezas presentes en recolectados o extractos celulares comunes da como resultado modos de interacción muy diversos con la fase sólida del medio de cromatografía y/o la proteína enlazada de interés. La unión más o menos fuerte de impurezas puede ser el resultado de interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals o una combinación de estos tipos de interacciones. Por lo tanto, una combinación de varios mecanismos diferentes para eliminar impurezas probablemente será mucho más efectiva que una metodología basada en un mecanismo simple para eliminar impurezas.
- 5
- 10 Con respecto a los efectos de la sal no reguladora en la solución de lavado, con base en los datos analíticos presentes, las interacciones de alta afinidad entre la proteína de interés y el ligando de la matriz de afinidad no son rotas por un lavado a concentraciones de sal no reguladora altas, a la vez que los contaminantes cargados unidos no específicamente a residuos cargados sobre ya sea el ligando inmovilizado o la proteína unida de interés son eliminados eficientemente. De acuerdo con lo anterior, a la vez que no se pretende estar limitados por un mecanismo, se considera que la sal no reguladora utilizada en la solución de lavado tiene la capacidad de romper las interacciones iónicas entre contaminantes cargados (impurezas) unidos no específicamente a residuos cargados sobre uno o más componentes de la matriz de cromatografía de afinidad (por ejemplo, el soporte químico de la matriz tal como una resina, el ligando de afinidad inmovilizado sobre la matriz y/o la diana de interés unida al ligando inmovilizado sobre la matriz), a la vez que no rompe la unión específica de la diana unida al ligando inmovilizado.
- 15
- 20 Con respecto a los efectos de la arginina en la solución de lavado, se ha informado que la arginina es capaz de solubilizar ciertas proteínas precipitadas (Umetsu, M. et al. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328:189-197; Tsumoto, K. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1383-1386), reducir la formación de agregados (Arakawa, T. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:148-152), y reducir la adsorción no específica de proteínas a superficies (Ejima, D. et al. (2005) *J. Chromatogr. A.* 1094:49-55). A la vez que no se pretende estar limitados por un mecanismo, la reducción de la agregación de proteína puede originarse a partir del enmascaramiento de parches hidrófobos sobre las proteínas, los cuales interactúan con la arginina. Esta interacción puede tener lugar entre el grupo guanidilo sobre la arginina y grupos triptófanos sobre las proteínas, o a través de la formación de un parche hidrófobo por aglomeración de arginina, o puede ser una combinación de tales efectos.
- 25
- 30 Con respecto al uso de un pH mayor a 8.0 en la solución de lavado, un pH básico puede desnaturar parcialmente las HCP y HMW, a la vez que las proteínas estables que incluyen anticuerpos monoméricos no son influenciadas a estas condiciones. A la vez que no se pretende estar limitados por el mecanismo, la desnaturación de proteínas contaminantes puede manifestarse como un cambio ligero en la estructura, el cual puede ser suficiente para debilitar un enlazamiento no específico, por lo tanto, el pH alto de la solución de lavado puede ser beneficioso para incrementar la eliminación de impurezas desestabilizando su interacción con la proteína unida de interés o el soporte sólido de la matriz de afinidad.
- 35
- De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención provee un método para producir un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc purificado, (la proteína de interés) utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (AC) a la cual se une el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc sobre la matriz AC; y (b) lavar la matriz AC con una solución de lavado que comprende tanto (i) arginina, o un derivado de arginina seleccionado del grupo consistente de acetil-arginina, N-alfa-butirol-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina, a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M, y (ii) una sal no reguladora a una concentración en un rango de 0.1-2.0 M, en el que la solución de lavado elimina impurezas de la matriz AC; y (c) eluir el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión, de la matriz AC; con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz AC se selecciona del grupo que consiste de una columna de Proteína A, una columna de Proteína G, una columna de Proteína A/G y una columna de Proteína L.
- 40
- 45
- Tal como se utiliza aquí, el término "matriz de cromatografía de afinidad" o "Matriz AC", pretende referirse a un medio en fase sólida, típicamente un gel o resina, que permite la separación de mezclas bioquímicas con base en una interacción de unión altamente específica entre una proteína de interés y la matriz AC, tal como entre un receptor y ligando, enzima y sustrato o antígeno y anticuerpo. Así, el medio en fase sólida comprende una diana a la cual la proteína de interés es capaz de fijarse de manera reversible, dependiendo de las condiciones de regulación. Ejemplos no limitantes de medios inmovilizados o en fase sólida que comprende la matriz AC incluyen una matriz en gel, tal como perlas de agarosa (tal como las matrices de Sepharose comercialmente disponibles) y una matriz de vidrio, tal como perlas de vidrio poroso (tales como las matrices ProSep comercialmente disponibles).
- 50
- 55 El enlazamiento de la proteína de interés a la matriz AC se logra típicamente por cromatografía de columna. Esto es, la matriz AC está formada dentro de una columna, una mezcla bioquímica que contiene una proteína de interés se hace fluir a través de la columna, seguida por lavado de la columna haciendo fluir a través de la columna una o más soluciones de lavado, seguidas por elución de la proteína de interés de la columna haciendo fluir a través de la columna un regulador de elución.

Alternativamente, el enlazamiento de la proteína de interés a la matriz AC puede lograrse por un tratamiento por lotes, en los cuales las mezclas bioquímicas que contienen la proteína de interés se incuban con la matriz AC en un recipiente para permitir la unión de la proteína de interés a la matriz AC, el medio en fase sólida es eliminado del recipiente (por ejemplo, por centrifugación), el medio en fase sólida es lavado para eliminar impurezas y de nuevo recuperado (por ejemplo, por centrifugación) y la proteína de interés es eluida del medio en fase sólida.

En aun otra realización, puede utilizarse una combinación de un tratamiento por lotes y cromatografía de columna. Por ejemplo, el enlazamiento inicial de la proteína de interés a la matriz AC puede lograrse por tratamiento por lotes y luego el medio en fase sólida puede ser empacado en una columna, seguido por un lavado de la columna y elución de la proteína de interés de la columna.

La naturaleza de una matriz en fase sólida particular, en particular las propiedades de enlazamiento de la diana unida a la fase sólida, determina los tipos de proteínas que pueden ser purificados utilizando esa matriz en fase sólida. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la matriz AC es una columna de Proteína A, la cual comprende como diana unida a la fase sólida una proteína de pared celular bacteriana, Proteína A, que se une específicamente a los dominios CH₂ y CH₃ dentro de la región Fc de ciertas inmunoglobulinas. Las propiedades de unión de la Proteína A están bien establecidas en la técnica. De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida de la invención, la proteína de interés (la que va a ser purificada) es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene una región Fc. Adicionalmente, proteínas adicionales que pueden ser purificadas utilizando cromatografía de Proteína A incluyen proteína de fusión Fc. En la medida en que cualquier proteína sea capaz de unirse específicamente a una matriz de Proteína A, puede ser purificada de acuerdo con los métodos de la invención.

Diversas resinas de proteína son bien conocidas en el arte y adecuadas para uso en la invención. Ejemplos no limitantes de resinas de Proteína A comercialmente disponibles incluyen MabSelect, MabSelect Xtra, MabSelect Sure, rProtein A Sepharose FF, rmpProtein A Sepharose FF, Protein A Sepharose CL-4B y nProtein A Sepharose 4 FF (todas comercialmente disponibles de GE Healthcare); ProSep A, ProSep-vA High Capacity, ProSep-vA Ultra y ProSep-Va Ultra Plus (todas comercialmente disponibles de Millipore); Poros A y Mabcapture A (ambos comercialmente disponibles de Poros); IPA-300, IPA-400 y IPA-500 (todas comercialmente disponibles de RepliGen Corp.); Affigel protein A y Affiprep protein A (ambos comercialmente disponibles de Bio-Rad); MABsorberent A1P y MABsorberent A2P (ambos comercialmente disponibles de Affinity Chromatography Ltd.); Protein A Ceramic Hyper D F (comercialmente disponibles de Pall Corporation); Ultralink Immobilized protein A y Agarose protein A (ambos comercialmente disponibles de PIERCE); y Protein A Cellthru 300 y Protein A Ultraflow (ambos comercialmente disponibles de Sterogen Bioseparations).

Además de la cromatografía de Proteína A, el método de lavado de la invención puede ser aplicado a otros sistemas de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, en otra realización, la matriz AC puede ser una columna de Proteína G, una columna de Proteína A/G o una columna de Proteína L, cada una de las cuales también es una proteína bacteriana de enlazamiento a inmunoglobulina con propiedades de unión establecidas en la técnica. Así, una matriz AC que es una matriz de Proteína G, una matriz de Proteína A/G o una matriz de Proteína L puede utilizarse para purificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo que comprende una región Fc y proteínas de fusión Fc.

Otros ejemplos no limitantes de matrices AC, y los tipos de proteínas que son efectivos en la purificación incluyen los siguientes: una columna de cromatografía de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC) (para purificación de proteínas con una afinidad por iones metálicos, tales como proteínas marcadas con histidina), una columna de resina de calmodulina (para purificación de proteínas marcadas con el péptido de enlazamiento calmodulina (CBP)), una columna MEP HyperCel™ (una matriz de celulosa que se une selectivamente a inmunoglobulina), una columna que enlaza proteína de unión a maltosa (MBP) (tales como una resina Dextrin Sepharose™ que une selectivamente proteínas marcadas con MBP), una columna que enlaza glutathione-S-transferasa (GST) (tal como una resina Glutathione Sepharose™ que une selectivamente proteínas marcadas con GST) y una columna que une Strep-Tag II (tal como una resina Strep-Tactin™ Sepharose que une selectivamente proteínas marcadas con Strep-Tag II). Adicionalmente, pueden utilizarse matrices de inmutafinidad, las cuales comprenden un anticuerpo como diana fijada a la fase sólida, para purificar un antígeno de interés que se une específicamente al anticuerpo fijado a la fase sólida.

Las soluciones de lavado de acuerdo con la invención comprenden arginina o un derivado de arginina. La arginina que puede ser utilizada en la presente invención puede ser el aminoácido arginina de origen natural (por ejemplo, L-arginina), D-arginina o un derivado de arginina seleccionado del grupo consistente de acetil arginina, N-alfa-butiroil-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil arginina. La arginina o derivado de arginina puede ser utilizado en la forma de una sal de adición ácida. Ejemplos del ácido que pueden formar una sal de adición ácida incluyen ácido clorhídrico y similares.

La concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado está entre 0.05 y 0.85 M (la cual es la solubilidad máxima de la arginina en agua a 20°C) (por ejemplo, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M, 0.5 M, 0.55 M, 0.6 M, 0.65 M, 0.7 M, 0.75 M, 0.8 M o 0.85 M), preferiblemente entre 0.1 y 0.5 M (por ejemplo, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M o 0.5 M). En diversas realizaciones, las concentraciones de arginina o derivados de arginina pueden ser, por ejemplo, 0.05 M, 0.1 M, 0.2M, 0.25M, 0.3M, 0.4

M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7m M o los 0.8M, o entre 0.1 y 0.5 M. En algunas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado es 0.25 M o mayor. En realizaciones particulares, la arginina está presente en una concentración de 0.1 M o aproximadamente 0.1 M, 0.25 M o aproximadamente 0.25 M, o 0.5 M o aproximadamente 0.5 M.

- 5 Las soluciones de lavado de la invención comprenden también una sal no reguladora, como se describió más arriba, la cual es de un tipo y está a una concentración suficiente para romper las interacciones iónicas entre impurezas y uno o más componentes de la matriz de afinidad. En una realización preferida, la sal no reguladora es una sal de halógeno. En una realización particularmente preferida, la sal no reguladora es cloruro de sodio (NaCl). En otras realizaciones, la sal no reguladora puede ser, por ejemplo, cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂) o
- 10 cloruro de magnesio (MgCl₂). La concentración de la sal no reguladora en la solución de lavado está entre 0.1 M y 2.0 M (*por ejemplo*, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M, 0.5 M, 0.55 M, 0.6 M, 0.65 M, 0.7 M, 0.75 M, 0.8 M, 0.85 M, 0.9 M, 0.95 M, 1.0 M, 1.1 M, 1.15 M, 1.20 M, 1.25 M, 1.30 M, 1.35 M, 1.40 M, 1.45 M, 1.5 M, 1.55 M, 1.6 M, 1.65 M, 1.7 M, 1.75 M, 1.8 M, 1.85 M, 1.9 M, 1.95 M, o 2.0 M), o entre 0.5 M y 1.5 M (*por ejemplo*, 0.5 M, 0.55 M, 0.6 M, 0.65 M, 0.7 M, 0.75 M, 0.8 M, 0.85 M, 0.9 M, 0.95 M, 1.0 M, 1.1 M, 1.15 M, 1.2 M, 1.25 M, 1.3 M, 1.35 M, 1.4 M, 1.45 M, o 1.5 M), o entre 1 M y 2 M (*por ejemplo*, 1 M, 1.1 M, 1.15 M, 1.2 M, 1.25 M, 1.3 M, 1.35 M, 1.4 M, 1.45 M, 1.5 M, 1.55 M, 1.6 M, 1.65 M, 1.7 M, 1.75 M, 1.8 M, 1.85 M, 1.9 M 1.95 M, o 2 M). En ciertas realizaciones, la concentración de sal no reguladora en la solución de lavado es 1 M o mayor. En realizaciones particulares, la sal no reguladora en la solución de lavado está presente a una concentración de 0.75 M o aproximadamente 0.75 M, 1.0 M o aproximadamente 1.0 M, o 1.25 M o aproximadamente 1.25 M.
- 20 El pH de las soluciones de lavado de la invención típicamente es mayor de 8.0, aunque también son adecuados valores de pH para uso en las soluciones de lavado de la invención. En una realización particular, el pH es mayor de 8.0, preferiblemente al menos 8.1, más preferiblemente al menos 8.5 u 8.9. En una realización, el pH de la una o más soluciones de lavado está en un rango de 8.1- 9.5. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado está en un rango de 8.5-9.5. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado es
- 25 aproximadamente 9.0. En otra realización, el pH de la una o más soluciones de lavado es 9.0. Alternativamente, dependiendo de la proteína de interés que va a ser purificada, puede usarse un valor de pH inferior, por ejemplo un pH en un rango de pH 5.0-8.0, o un pH de 7.5 o 7.0 o 6.5 o 5.0. Dependiendo de las propiedades de la proteína que va a ser purificada, la persona experimentada en la técnica puede seleccionar un valor de pH apropiado para la solución de lavado. De acuerdo con lo anterior, las soluciones de lavado pueden contener uno o más reguladores para ajustar y/o mantener el pH. Ejemplos no limitantes de reguladores típicos que pueden ser incluidos en las soluciones de lavado incluyen Tris (tris(hidroximetil)metilamina), bis-Tris, bis-Tris propano, histidina, trietanolamina, dietanolamina, formiato, acetato, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), fosfato, HEPES (ácido 4-2-hidroxietyl-1-piperazinetasulfónico), citrato, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico), Bicine (N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina), Tricine (N-
- 35 tris(hidroximetil)metilglicina), TES (ácido 2-[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanosulfónico), PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico), cacodilato (ácido dimetilarsínico) y SSC (citrato de sodio salino).

La combinación de lavado de arginina y sal no reguladora descrita aquí se aplica en una solución de lavado individual que contiene ambos componentes. En otros métodos que no son cubiertos por las reivindicaciones, pueden usarse dos soluciones de lavado, una que contiene arginina o derivado de arginina (preferiblemente a un pH alto) y la otra que contiene una sal no reguladora, en lavados en tándem. De acuerdo con lo anterior, en tal método de lavado, la matriz AC es lavada con dos soluciones de lavado, una primera solución de lavado y una segunda solución de lavado, antes de la elución de la proteína de interés. Por ejemplo, la primera solución de lavado comprende arginina, o un derivado de arginina (preferiblemente a un pH superior a 8.0) y la segunda solución de lavado comprende una sal no reguladora. En otro ejemplo, la primera solución de lavado comprende una sal no reguladora y la segunda solución de lavado comprende arginina, o un derivado de arginina (preferiblemente a un pH superior a 8.0). Ejemplos de derivados de arginina y sales reguladoras adecuados, así como concentraciones, rangos de concentraciones y condiciones de pH preferidos para las soluciones de lavado son como se describió más arriba.

El método de lavado de la invención es efectivo en eliminar una variedad de impurezas, incluyendo especies de alto peso molecular (HMW) y proteínas de la célula huésped (HCP). Como se describe en detalle en los ejemplos, las soluciones de lavado de la invención son efectivas para reducir tanto especies HMW como HCP en el eluido, mientras que se alcanza un rendimiento en porcentaje alto de la proteína de interés en el eluido y una alta concentración de la proteína de interés en el eluido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el uso del método de lavado descrito aquí da como resultado un rendimiento en porcentaje de la proteína de interés que es superior a 95%, más preferiblemente superior a 96%, aún más preferiblemente superior a 97%. Con respecto a la reducción en las especies HMW en el eluido, la cual puede ser expresada como el porcentaje de HMW en el eluido, en diversas realizaciones el uso del método de lavado descrito aquí da como resultado un porcentaje de HMW en el eluido que es menor de 10% o menor de 5%, o menor de 2.0%, o menor de 1% o menor de 0.5%. Con respecto a la reducción en HCP en el eluido, la cual puede ser expresada como el valor de reducción logarítmico (LRV), en diversas realizaciones el uso del método de lavado descrito aquí da como resultado un LRV para los HCP en el eluido que es al menos 1.1, o al menos 1.3, o al menos 1.5, o al menos 2.0, o al menos 2.3, o al menos 2.5, o al menos 2.7.

- Aunque la invención se describe aquí con respecto a una etapa de lavado durante la cromatografía de afinidad, será fácilmente evidente para la persona experimentada en la técnica que se llevan a cabo etapas adicionales tanto antes como después de la etapa de lavado para alcanzar la purificación de la proteína de interés a partir de la matriz de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, antes de la etapa de lavado, los métodos de la invención pueden incluir una
- 5 etapa de equilibrio, en la cual la matriz de cromatografía de afinidad es equilibrada con un regulador de carga, y una etapa de carga o captura, en la cual se aplica una mezcla bioquímica (por ejemplo, recolección celular) que contiene la proteína de interés, a la matriz AC. Condiciones adecuadas para los reguladores de equilibrio y carga variarán dependiendo de la naturaleza de la matriz AC y de la proteína de interés que va a ser purificada, y el experto en la técnica podrá determinar fácilmente tales condiciones usando métodos e información bien establecidas en el arte.
- 10 Ejemplos no limitantes de reguladores de equilibrio y carga para la purificación de anticuerpos sobre columnas de Proteína A se fijan en los ejemplos 1 y 2. Adicionalmente, después de las etapas de lavado como se mencionó más arriba, los métodos de la invención pueden incluir una o más etapas de lavado utilizando soluciones de lavado comunes, y/o una etapa de elución, en la cual se aplica un regulador de elución a la matriz de cromatografía de afinidad para eludir la proteína de interés a partir de la matriz. Las condiciones adecuadas para el regulador de elución variarán dependiendo de la naturaleza de la matriz AC y de la proteína de interés que va a ser purificada, y la persona experimentada en la técnica puede determinar fácilmente tales condiciones usando métodos e información bien establecidos en el arte. Típicamente la elución de la proteína de interés a partir de la matriz AC se lleva a cabo a un pH ácido. Ejemplos no limitantes de reguladores de elución para la purificación de anticuerpos sobre columnas de Proteína A están definidos en los ejemplos 1 y 2.
- 15
- 20 En otro aspecto, la invención provee métodos preferidos para eliminar impurezas a partir de mezclas que contienen anticuerpos durante la purificación de Proteína A del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, la invención provee un método para producir un anticuerpo purificado, o un fragmento de anticuerpo, usando una columna de Proteína A, comprendiendo el método
- 25 a) descargar una mezcla que comprende el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, sobre la columna de Proteína A;
- b) lavar la columna de Proteína A con una solución de lavado que comprende (i) arginina-HCL a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M, (preferiblemente en un rango de 0.1-0.5 M) y (ii) cloruro de sodio a una concentración en un rango de 0.1-2.0 M, en donde la solución de lavado elimina impurezas a partir de la columna de Proteína A; y
- c) hervir el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de la columna de Proteína A.
- 30 Preferiblemente, la solución de lavado está a un pH superior a 8.0. Concentraciones y rangos de concentración preferidos para la arginina -HCL son como se describió más arriba. Por ejemplo, en una realización preferida, la arginina-HCL está a una concentración de aproximadamente 0.25 M o a una concentración de 0.25 M. Concentraciones y rangos de concentración preferidos para el cloruro de sodio son como se describió más arriba. Por ejemplo, en una realización preferida, el cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 1 M o a una concentración de 1M. Valores de pH y rangos de pH preferidos también son como se describió más arriba. Por
- 35 ejemplo, en una realización, el pH de la solución de lavado está en un rango de 8.1- 9.5. En otra realización el pH de la solución de lavado es 8.5 o mayor. En otra realización, el pH de la solución de lavado es 9.0.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

40 **Ejemplo 1: Comparación de Solución de Lavado de Arginina/Sal No Reguladora con Otras Soluciones de Lavado**

En este ejemplo, se compara la efectividad de diversas soluciones de lavado para eliminar impurezas de una solución que contiene anticuerpos durante la cromatografía de afinidad. Más específicamente, se comparan tres

45 soluciones de lavado: una que no contiene arginina ni sal no reguladora a pH 5.0, la segunda que contiene sal no reguladora pero no arginina a pH 7.0, y la tercera que contiene tanto sal no reguladora como arginina a pH 9.0.

Se recolectan sobrenadantes de cultivo celular de mamífero, clarificados entre 1.5 y 2.5 g/L de anticuerpo por filtración profunda y se purifican utilizando una columna ALC, en particular una columna de Proteína A (GE Healthcare), de acuerdo con las condiciones descritas a continuación en Tabla 1:

Tabla 1 condiciones de operación para columna de proteína A

Etapa	Regulador	CV **	Tiempo de Residencia * (min)
Equilibrio	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.0	6	4
Carga	Recolección libre de células	q.s.	4
Lavado 1	Variable (Véase Tabla 2)	3	4
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.0	3	4
Elución	Acido acético 20 mM	4	4
CIP	NaOH 0.1 M	3	4
Almacenamiento	Acido acético 20 mM/Acetato de sodio, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	4	4

* Tiempo de Residencia = tiempo de residencia;
 **: CV, volumen de columna

5 La columna equilibrada es cargada con la recolección clarificada y lavada primero con solución de lavado 1, descrito en la tabla 2 a continuación, seguida por un segundo lavado con la solución de lavado 2 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7.0), y luego se eluye a pH bajo. El eluido es analizado en cuanto a su concentración de anticuerpo por ALC analítica, para HMW/LMW por cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC) y en cuanto al contenido de HCP por ensayo de inmunosorción enlazado a enzima, desarrollado sobre la misma línea celular. Las diversas soluciones de lavado comparadas para el primer lavado se muestran a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2 Soluciones de lavado variantes para primer lavado

Solución	Regulador	Abreviatura de regulador
1	Acetato de sodio 20 mM, ácido acético 6 mM pH 5.0	W1-A5
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM , pH 7.0	W2-N7
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 250 mM , NaCl 1 M, NaOH * pH 9.0	W3-Arg/N9

* pH ajustado con solución de NaOH al 32%

10

Los rendimientos porcentuales de la purificación en proteína de cuatro diferentes anticuerpos monoclonales (mAb), usando las tres soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 2, se presentan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3 Rendimientos porcentuales de diversos anticuerpos usando diversas soluciones de lavado

Anticuerpo	Solución de Lavado		
	W1-A5	W2-N7	W3-Arg/N9
mAb-Qg	81.2	101.3	97.8
mAb-By	86.6	96.5	97.6
mAb-Bp	95.7	92.5	95.8
mAb-Va	96.5	97.9	98.6

5 La tabla 3 muestra que al lavar con W1-A5 (que no contiene sal reguladora o arginina, a pH 5.0) o W2-N7 (que contiene sal no reguladora pero no arginina, a pH 7.0) da como resultado fluctuaciones en la cantidad de anticuerpo recuperado dependiendo del anticuerpo que está siendo purificado. Más específicamente, el lavado con W1-A5 da como resultado rendimientos que fluctúan entre 81 y 96% y el lavado con W2-N7 da como resultado rendimientos que fluctúan entre 92 y 101%. En contraste, al lavar con W3-Arg/N9, que contienen tanto sal no reguladora como arginina, a pH 9.0, da como resultado rendimientos consistentemente altos, por encima del 96%, para todos los cuatro anticuerpos que están siendo purificados.

10 Las concentraciones del eluido (en g/L), después de la purificación en proteína A de los cuatro diferentes mAbs, usando las tres soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 2, se presentan a continuación en la tabla 4.

Tabla 4 Concentración de eluidos de diferentes anticuerpos usando diversas soluciones de lavado

Anticuerpo	Solución de Lavado		
	W1-A5	W2-N7	W3-Arg/N9
mAb-Qg	17.3	17.7	28.4
mAb-By	12.6	19.8	21.0
mAb-Bp	23.5	17.2	21.2
mAb-Va	15.1	14.3	16.4

15 La tabla 4 muestra que la concentración de eluido también está influenciada por el regulador de lavado aplicado durante ALC. Para tres de los cuatro mAbs (mAbs Qg, By y Va), el lavado con W3-Arg/N9 da como resultado concentraciones en el eluido mayores que lavando con W1-A5 o W2-N7. La concentración en eluido promedio para los cuatro anticuerpos es inferior después del lavado con W1-A5 (17.1 g/L), seguida por el lavado con W2-N7 (17.3 g/L) y más alto después del lavado con W3-Arg/N9 (21.7 g/L).

20 La reducción en la proteína de célula huésped (HCP) en los eluidos después de la purificación en Proteína A de los cuatro diferentes mAbs, usando las tres soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 2, se presenta a continuación en la tabla 5. La reducción en HCP se expresa como el valor de reducción logarítmico (LRV) con respecto a los valores en la recolección celular.

Tabla 5 Reducción en HCP en eluido para cuatro anticuerpos diferentes usando diversas soluciones de lavado

Anticuerpo	Solución de Lavado		
	W1-A5	W2-N7	W3-Arg/N9
mAb-Qg	1.50	1.64	2.75
mAb-By	1.40	1.68	2.15
mAb-Bp	1.77	1.88	2.53
mAb-Va	0.94	0.99	1.33

5 Con respecto a la eliminación de impurezas, con base en los datos en la tabla 5 puede establecerse un orden claro entre los tres reguladores de lavado. La reducción de HCP más baja se obtiene con el lavado a pH bajo con W1-A5, seguido por el lavado con sal de lavado W2-N7 y el factor de eliminación más alto se tiene con el regulador de combinación arginina-NaCl a pH 9.0 (W3-Arg/N9). Expresado en orden logarítmico de eliminación, se obtiene un promedio de 1.4 escalas logarítmicas después del lavado con W1-A5, 1.5 5 escalas logarítmicas con W2-N7 y la eliminación más alta de 2.2 escalas logarítmicas se alcanza con W3-Arg/N9.

10 El nivel de especies de alto peso molecular (HMW) en los eluidos después de la purificación en Proteína A de los cuatro diferentes mAbs, utilizando las tres diferentes soluciones de lavado mostradas en la tabla 2, se presentan a continuación en la tabla 6. El nivel de las especies HMW en los eluidos se expresa como un porcentaje (%) de la proteína total en los eluidos.

Tabla 6 Nivel de especies HMW en eluido para diferentes anticuerpos utilizando diversas soluciones de lavado.

Anticuerpo	Solución de Lavado		
	W1-A5	W2-N7	W3-Arg/N9
mAb-Qg	4.7	3.8	0.8
mAb-By	2.1	0.7	0.4
mAb-Bp	10.4	10	9.8
mAb-Va	4.1	2.9	1.6

15 La tabla 6 muestra que el nivel de especie de HMW es muy heterogéneo para los 4 mAbs mAb diferentes y la eliminación de HMW es dependiente de mAb. Globalmente, la solución de lavado W1-A5 es la solución de lavado menos efectiva. Se obtienen mejores resultados con la solución de lavado W2-N7 y los valores de HMW más bajos en el eluido ALC se encuentran consistentemente con la solución de lavado W3-Arg/N9. Tres mAbs (mAbs Qg, By y Va) responden con una reducción de 2.6 a 5.9 veces en HMW en comparación con el lavado con W1-A5 versus es lavado con W3-Arg/N9, mientras que el mAb-Bp mostró solamente una reducción marginal.

Un resumen de los hallazgos para los experimentos resumidos en las tablas 3-6 se muestra a continuación en la tabla 7. La columna sombreada representa la composición de la recolección.

ES 2 651 065 T3

Tabla 7 Comparación de tres soluciones ALC de lavado para cuatro mAbs

mAb	Regulador de lavado	Rendimiento [%]	Conc. [g/L]	HCP [ppm]	HCP [LRV]	HMW [%]
Va	Recolección	NA	1.53	337739	NA	NA
Va	Acetato pH5.0	96.5	15.1	38620	0.94	4.1
Va	NaCl pH 7.0	97.9	14.3	34522	0.99	2.9
Va	Arg/NaCl pH 9.0	98.6	16.4	15618	1.33	1.6
Qg	Recolección	NA	1.65	645236	NA	NA
Qg	Acetato pH 5.0	81.2	17.3	20393	1.500237	4.7
Qg	NaCl pH 7.0	101.3	17.7	14673	1.6432	3.8
Qg	Arg/NaCl pH 9.0	97.8	28.4	1150	2.749021	0.8
By	Recolección	NA	2.29	528326	NA	NA
By	Acetato pH 5.0	86.6	12.6	20955	1.401614	2.1
By	NaCl pH 7.0	96.5	19.8	11111	1.677149	0.7
By	Arg/NaCl pH 9.0	97.6	21.0	3738	2.150263	0.4
Bp	Recolección	NA	1.69	523191	NA	NA
Bp	Acetato pH 5.0	95.7	23.5	8830	1.7727	10.4
Bp	NaCl pH 7.0	92.5	17.2	6845	1.883287	10
Bp	Arg/NaCl pH 9.0	95.8	21.2	1543	2.530294	9.8

Conc. = concentración en eluido;
HCP = proteína de célula huésped;
HMW = especie de alto peso molecular;
LRV = valor de reducción logarítmico;
NA = no aplicable.

Ejemplo 2: Comparación de diversas soluciones de lavado de arginina/sal

- 5 En este ejemplo, se compara la efectividad de soluciones de lavado adicionales, que contienen cantidades diferentes de sal no reguladora y/o arginina a diferentes valores de pH, para eliminar impurezas durante la cromatografía líquida de afinidad (ALC). Las condiciones de cromatografía usadas en este ejemplo son como las establecidas en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8 Condiciones de operación para columna de proteína A

Etapa	Regulador	CV **	Tiempo de residencia* (min)
Equilibrio 1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.0	3	4
Equilibrio 2	Idéntico a regulador de lavado 1	3	4
Carga	Recolección libre de células	q.s.	4
Lavado 1	Variable (Véase Tabla 9)	6	4
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM pH 7.0	3	4
Elución	Acido acético 50 mM	5	4
CIP	NaOH 0.1 M	3	4
Almacenamiento	Acido acético 20 mM/Acetato de sodio, 2% de Alcohol bencílico, pH 5.1	5	4

* Tiempo de Residencia = tiempo de residencia;
 **: CV, volumen de columna

Las soluciones de lavado en este ejemplo se definen a continuación en la tabla 9:

Tabla 9 Soluciones de lavado variantes adicionales para el primer lavado

Solución	Regulador	Abreviatura de regulador
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7.0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0	W4-0.15M N7
3	Arginina-HCl 50 mM, Tris -HCl -18 * mM, pH 8.0	W5-Arg8
4	Tris-HCl~18 * mM, Arginina-HCl 250 mM , NaCl 1 M, pH 8.0	W6-Arg/N8

* La concentración exacta no fue medida (Se usó base Tris [(hidroximetil) aminometano]1M para ajustar el pH)

5

Las cuatro soluciones de lavado mostradas en la tabla 9 permiten una comparación directa de una solución de lavado baja en sal no reguladora (W4-0.15M N7, que contenía NaCl 150 mM) con respecto a una solución de lavado con alto contenido de sal no reguladora (W2-N7, que contenía NaCl 1M), así como una comparación de una solución de lavado que contiene arginina sola a pH 8.0 (W5-Arg8) con una solución de lavado que contiene la combinación de sal no reguladora con arginina a pH básico (W6-Arg/N8).

10

El rendimiento porcentual, porcentaje de especies a HMW en el eluido y la reducción en HCP (expresado como LRV) para purificación por mAb-By, utilizando las cuatro soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 9, así como la combinación del lavado con arginina sola (W5-Arg8) con el lavado solo con contenido alto de sal (W2-N7), se muestran a continuación en la tabla 10.

5 Tabla 10 Valores de purificación para mAb-By utilizando diversas soluciones de lavado

Valor de Purificación	Solución de Lavado				
	W4-0.15M N7	W2-N7 LW *	W5-Arg8	W5-Arg8. W2-N7	W6-Arg/N8
Rendimiento (%)	98.4	100	99.3	97.4	97.9
HMW (%)	1.6	0.9	0.5	0.3	0.3
HCP (LRV)	1.81	2.19	2.35	2.57	2.7

* LW = el lavado fue llevado a cabo para 12 volúmenes de columna en vez de 6.

10 La tabla 10 muestra que el rendimiento porcentual del anticuerpo permanece por encima de 97% para todas las condiciones de lavado. Además, las soluciones de lavado más eficientes para la eliminación de impurezas, tanto HMW como HCP, son las soluciones de lavado que contienen tanto arginina como sal no reguladora en contenido alto a pH básico (W6-Arg/N8) o el uso combinado de las soluciones de lavado que contienen arginina a pH básico (W5-Arg8) y sal no reguladora en alto contenido (W2-N7).

15 El lavado con una solución de lavado más bien fisiológico, W4-0.15M N7, reduce las HCP en 64 veces (1.81 escalas logarítmicas) en comparación con el material de partida que se carga sobre la columna. En contraste, el lavado con una combinación de sal no reguladora -arginina a pH 8 (W6-Arg/N8) da como resultado una reducción en 498 veces (2.7 escalas logarítmicas).

La reducción de HMW sigue una tendencia similar. El lavado con la solución de lavado que contiene fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0 (W4-0.15M N7) da como resultado 1.6% de HMW en el eluido, mientras que el lavado con la combinación de sal no reguladora -arginina (W6-Arg/N8) reduce este valor en más de 5 veces.

Ejemplo 3: Comparación de pH Básico con pH fisiológico en Soluciones de Lavado

20 En este ejemplo, se lleva a cabo un análisis del pH como parámetro de las soluciones de lavado en la eliminación de HCP y HMW y muestra la superioridad de las condiciones de pH básico. La cromatografía líquida de afinidad (ALC) utilizando las condiciones fijadas en la tabla 8 en el ejemplo 2, se lleva a cabo sobre una recolección celular de mAb-Va, con niveles ligeramente diferentes de HMW y HCP.

Las soluciones de lavado comparadas en este ejemplo se definen a continuación en la tabla 11:

25 Tabla 11 Soluciones de lavado con diferentes valores de pH para el primer lavado (en mAb-Va)

Solución	Regulador	Abreviatura del regulador
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7.0	W2-N7
2	Na ₂ HPO ₄ 13.2 mM, 250 mM Arginina HCl, NaCl 1 M, pH 7.0	W6-Arg/N7
3	* Tris ~289 mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, pH 8.9	W3b-Arg/N8.9

Solución	Regulador	Abreviatura del regulador
* No se utilizó NaOH para el ajuste de pH		

El rendimiento porcentual, porcentaje de especies HMW en el eluido, y la reducción en HCP (expresada como LRV) para la purificación de mAb-Va, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 11, se presenta a continuación en la tabla 12.

5 Tabla 12 Comparación de pH Fisiológico con pH básico sobre los valores de purificación para mAb-Va

Valor de Purificación	Solución de Lavado		
	W2-N7	W6-Arg/N7	W3b-Arg/N8.9
Rendimiento (%)	100.5	99.4	99
HMW (%)	2.4	1.6	1.4
HCP (LRV)	0.87	1.48	1.61

10 La solución de lavado con alto contenido de sal no reguladora sola, W2-N7, sirve como lavado de control de línea de base para establecer la capacidad de eliminación de HCP/HMW de la combinación de arginina/sal no reguladora a aproximadamente pH 7.0 fisiológico (solución de lavado W6-Arg/N7) y a pH básico 8.9 (solución de lavado W3b-Arg/N8.9). Se observa una reducción pequeña pero notable en los niveles HMW de 1.6 a 1.4% al pH más alto (pH 8.9) en comparación con el pH más bajo (pH 7.0). Más evidente es el efecto sobre la eliminación de HCP. Aquí, el lavado a pH más bajo (pH 7.0) reduce los HCP en 1.48 escalas logarítmicas, mientras que el lavado a pH alto (pH 8.9) reduce el valor en 1.61 escalas logarítmicas, subrayando la superioridad del lavado a pH alto en la capacidad de eliminación de impurezas.

15 **Ejemplo 4: Comparación de la Solución de Lavado de Arginina/Sal Con Otras Soluciones de Lavado**

20 En este ejemplo, se comparan otras soluciones de lavado, que contiene en Tween 80, aminoácidos diferentes a la arginina o altas concentraciones de Tris, con las soluciones de lavado de arginina/sal no reguladora. En este ejemplo, se lleva a cabo un análisis del pH como parámetro de las soluciones de lavado sobre la eliminación de HCP y HMW y muestra la superioridad de las condiciones de pH básicas. La cromatografía líquida de afinidad (ALC) utilizando las condiciones definidas en la tabla 1 en el ejemplo 1, se lleva a cabo sobre una recolección celular de mAb-Va, con niveles ligeramente diferentes de HMW y HCP.

Las soluciones de lavado comparadas en este ejemplo se definen a continuación en la tabla 13:

Tabla 13 Soluciones de lavado con componentes variables para el primer lavado

Solución	Regulador	Abreviatura de regulador
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7.0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7.0	W2-N7 LW*
3	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, Tween80, 0.1 % (p/v), pH 7.0	W7-N7-T80

Solución	Regulador	Abreviatura de regulador
4	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, Glicina 0.1 M, Tris **	W8-N7-0.1 M G
5	Tris 500 mM, pH 8.9	W9-0.5 M Tris 8.9 LW*
6	Tris 289 mM, Arginina-HCl, NaCl 1 M, pH 8.9	W3b-Arg/N8.9

* LW = el lavado fue llevado a cabo para 12 volúmenes de columna en vez de 6.
 ** el pH se ajustó con solución de reserva 1 M, concentración no medida.

El rendimiento porcentual, porcentaje de especies de HMW en el eluido y la reducción en HCP (expresada como LRV) para la purificación de mAb-Va, utilizando las seis diferentes soluciones de lavado mostradas en la tabla 13, se muestran a continuación en la tabla 14.

5 Tabla 14 Comparación de los componentes de solución de lavado sobre los valores de purificación para mAb-Va

	Solución de Lavado					
Valor de Purificación	W2-N7	W2-N7 LW *	W7-N7-T80	W8-N7-0.1 M G	W9-0.5 M Tris 8.9 LW *	W3b-Arg/N8.9
Rendimiento (%)	100.5	100.9	99	98.7	98.1	99
HMW (%)	2.4	2.3	2.5	3.1	3	1.4
HCP (LRV)	0.87	1.42	1.34	1.24	1.07	1.61

* LW = el lavado fue llevado a cabo para 12 volúmenes de columna en vez de 6.

10 La Tabla 14 muestra que la solución de lavado de arginina/sal no reguladora a pH alto (W3b-Arg/N8.9) es la solución de lavado más eficiente en la eliminación tanto de HMW como de HCP, en comparación con otras soluciones de lavado que contienen sal no reguladora en un contenido alto sola (W2-N7), Tween 80 (W7-N7-T80), otros aminoácidos tales como glicina (W8-N7-0.1 M G) o altas concentraciones de Tris (LW W9-0.5 M Tris 8.9).

Ejemplo 5: Comparación de solución de lavado de arginina/Sal no reguladora a pH alto con sal sola a pH bajo y alto

15 En este ejemplo, se comparó la efectividad de la solución de lavado de arginina/sal no reguladora a un pH alto con una solución de sal no reguladora a pH alto y bajo. Específicamente, se evaluó y comparó la siguiente condición: (1) solución de lavado de sal no reguladora a pH bajo (esto es, 7.0), (2) solución de lavado de sal no reguladora a un pH alto (esto es, 9.0), y (3) solución de lavado de sal no reguladora en combinación con arginina a un pH alto (esto es, 9.0). Adicionalmente, se analizó el efecto de la arginina sobre la eliminación de HMW, LMW y HCP, y muestra que el uso de solución de sal no reguladora en combinación con arginina a condiciones de pH básico es particularmente efectivo y ventajoso. Las soluciones de lavado comparadas en este ejemplo se establecen a continuación en la tabla 15:

20

Tabla 15 Soluciones de lavado con componentes variantes para el primer lavado

Solución	Regulador	Abreviatura del regulador
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM , pH 7.0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM , NaOH, pH 9.0 *	W10-N9
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 250 mM , NaCl 1 M, NaOH, pH 9.0 *	W3-Arg/N9

*, pH ajustado a 9.0 con solución de reserva de NaOH al 32 %.

5 La cromatografía líquida de afinidad (ALC) utilizando las condiciones definidas en la tabla 1 en el ejemplo 1, se lleva a cabo sobre una recolección celular de mAb-By, utilizando diferentes niveles de HMW y HCP con variaciones mínimas, como se detalla a continuación en tabla 16.

Tabla 16 Condiciones de operación para columna de proteína A

Etapa	Regulador	CV	Tiempo de residencia ** (min)	Comentario
Equilibrio	NaH ₂ -/Na ₂ H-PO ₄ 20 mM, pH 7.0	5/6*	4	
Carga	Recolección libre de células		4	36 mg/ml Resina
Lavado 1	Véase Tabla 15	6	4	
Lavado 2	EQ	3	4	
Elución	Acido acético 20 mM, pH tq***	5/4*	4	100-100 mAU a 280 nm
CIP	NaOH 0.1 M	4	4	
Almacenamiento	Acetato de Na 20 mM, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	5/4*	4	

*, para el análisis con solución de lavado W3-Arg/N9, se usaron 6 CV para equilibrio y 4 CV para elución y almacenamiento.
 **, Tiempo de Residencia = tiempo de residencia.
 ***, tq = tal cual (como está).

10 Los parámetros de (1) concentración de anticuerpos derivado de SEC (g/L), (2) porcentaje de especies de HMW y LMW, (3) nivel de HCP expresado en ng/mg de anticuerpo monoclonal y, (4) rendimiento porcentual derivado de ALC en el eluido de ALC fueron medidos para la purificación de mAb-By, utilizando las tres diferentes soluciones de lavado mostradas en la tabla 15. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 17.

Tabla 17 Comparación de componentes de la solución de lavados sobre los valores de purificación para mAb-By

Solución de Lavado	Conc. (g/L)	HMW (%)	LMW (%)	HCP (ng/mg MAb)	Rendimiento (%)
Material de partida	2.32	NA	NA	370962	(100)
W2-N7	20.00/19.84*	1.3/0.9*	0.4/0.4*	9315/6783*	100.8/ND*
W10-N9	20.28/20.10*	1.2/1.0*	0.5/0.5*	8984/7884*	101.9/y*
W3-Arg/N9	20.55	0.8	0.1	2110	100.3/ND*

*, el segundo valor corresponde a una segunda medición después de la filtración a través de un filtro de 0.2 µm.

5 Específicamente, la tabla 17 muestra que la solución de lavado de arginina/sal no reguladora a pH alto de 9.0 (W3-Arg/N9) es la solución de lavado más eficiente para eliminar HMW, LMW y HCP, en comparación con otras soluciones de lavado que contienen sal no reguladora sola (W2-N7 y W10-N9), independientemente de su pH. En particular, el lavado con la solución de lavado de arginina/sal no reguladora a un pH de 9.0 redujo los HCP en al menos 3 veces y los LMW en al menos 4 veces, en comparación con el lavado con la sal no reguladora sola a un pH de 7 (W2-N7) o un pH de 9 (W10-N9).

10 **Ejemplo 6: Comparación de rangos de concentraciones de arginina y NaCl y pH para la solución de lavado de arginina/sal**

En este ejemplo, se investigaron condiciones de lavado con concentraciones adicionales de arginina y sal no reguladora para determinar su efectividad en la eliminación de impurezas durante la cromatografía líquida de afinidad (ALC). Las soluciones de lavado comparadas en este ejemplo están definidas en la tabla 18 a continuación:

Tabla 18 Soluciones de lavado con componentes variables para primer lavado

Solución	Regulador	Abreviatura de regulador
1	NaCl 0.75 M, L-Arginina 250 mM /Tris pH 8.5 *	W11-Arg/N8.5
2	NaCl 1.25 M, L-Arginina 250 mM /Tris, pH 9.5 *	W12-Arg/N9.5
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 500 mM, NaCl 1 M, NaOH, pH 9.0 *	W13-Arg/N9
4	Tris 10 mM, Arginina-HCl 100 mM, NaCl 1 M, NaOH, pH 9.0 *	W14-Arg/N9 **

*, pH ajustado con NaOH 8 M;
 **, regulador obtenido a través de una dilución 5 veces de W13-Arg/N9 y ajuste de pH a 9.0 con NaOH 8 M

15 La ALC se lleva a cabo sobre una recolección celular de mAb-By (bajo las condiciones definidas en la tabla 1 en el ejemplo 1), utilizando niveles ligeramente diferentes de HMW y HCP con variaciones mínimas, como se detalla más adelante en la tabla 19.

ES 2 651 065 T3

Tabla 19 Condiciones de operación para columna de proteína A (con tiempo de residencia de 4 minutos)[†]

Etapa	Regulador	CV	Comentario
Equilibrio	NaH ₂ -/Na ₂ H-PO ₄ 20 mM, pH 7.0	6	
Carga	Recolección libre de células		38 mg/ml resina
Lavado 1	Véase Tabla 18	4.5*/7.5**/6****	
Lavado 2	EQ	3	
Elución	Ácido acético 50 mM, pH 3.5 */**/** o ácido acético 50 mM, pH 3.8 ****/*****	4/6****	500-500 mAU/cm a 280 nm
CIP	NaOH 0.1 M	4/3****	Flujo hacia arriba
Almacenamiento	Acetato de Na 20 mM, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	4	Flujo hacia arriba

*, para análisis con solución de lavado W11-Arg/N8.5;
 **, para análisis con solución de lavado W12-Arg/N9.5;
 ***, pH ajustado con Tris 1 M;
 **** para análisis con solución de lavado W13-Arg/N9 y W14-Arg/N9;
 *****, pH ajustado con NaOH 8 M.
[†]Tiempo de Residencia = tiempo de residencia.

5 Los parámetros de (1) concentración de anticuerpo derivado de SEC (g/L), (2) porcentaje de especies de HMW y LMW (%), (3) nivel de HCP expresado en ng/mg de anticuerpo monoclonal y (4) rendimiento porcentual derivado de ALC en el eluido de ALC medido después de la purificación de mAb-By utilizando cualquiera de las dos soluciones de lavado diferentes mostradas en la tabla 18. Estos resultados se muestran a continuación en la tabla 20.

Tabla 20 Eficiencia del regulador de lavado a diferentes concentraciones de NaCl y niveles de pH para la purificación de mAb-By (dos materiales de partida diferente)

Solución de lavado aplicada	Concentración	HMW	LMW	HCP (ng/mg)	Rendimiento	(%)
	(mg/ml) (SEC)	(%)	(%)		(ALC)	
Material de partida	2.6	NA	NA	602398	(100)	
W12-Arg/N9.5	27.35	2.1	0.3	4637	100.4	
W11-Arg/N8.5	22.42	2.1	0.5	9922	100.2	
Material de partida	2.91	NA	NA	311761	(100)	
W13-Arg/N9	16.15	1.7	0.1	1367	98.7	

ES 2 651 065 T3

Solución de lavado aplicada	Concentración	HMW	LMW	HCP (ng/mg)	Rendimiento	(%)
	(mg/ml) (SEC)	(%)	(%)		(ALC)	
W14-Arg/N9	16.31	1.7	0.1	3405	95.9	

5 Los datos mostrados en la tabla 20 clasifican la eficacia de la solución de lavado de arginina/sal no reguladora a pH alto, para uso para cromatografía líquida de afinidad. El lavado con (1) arginina y una concentración inferior de sal no reguladora (NaCl 0.75 M) a un pH de 8.5, (2) arginina a una concentración más alta de sal no reguladora (NaCl 1.25 M) a un pH de 9.5 o (3) concentraciones bien sea bajas (por ejemplo, 100 mM) o altas (por ejemplo, 500 mM) de arginina, da como resultado una reducción fuerte de HCP (en promedio reducción de > 2 escalas logarítmicas), sin comprometer el rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc purificado, utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (AC) a la cual se enlaza el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método:
- 5 (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc sobre la matriz AC; y
- (b) lavar la matriz AC con una solución de lavado que comprende tanto (i) arginina, o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste de acetil arginina, N-alfa-butirol-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina, a una concentración en un rango de 0.05-0.85 M y (ii) una sal no reguladora a una concentración en
- 10 un rango de 0.1-2.0 M, en el que la solución de lavado elimina impurezas de la matriz AC; y
- (c) eluir el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión Fc, de la matriz AC;
- con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz AC se selecciona del grupo consistente de una columna de Proteína A, una columna de Proteína G, una columna de proteína A/G y una columna de Proteína L.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz AC es una columna de Proteína A.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la sal no reguladora es una sal de halógeno.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la sal de halógeno es cloruro de sodio.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método es para producir una proteína de fusión Fc purificada y la matriz AC es una columna de Proteína A, una columna de Proteína G, una columna de
- 20 Proteína A/G o una columna de Proteína L.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el método es para producir un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo purificado.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la arginina o derivado de arginina está a una concentración de o alrededor de 0.25 M.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la arginina es arginina-HCl.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la sal no reguladora está a una concentración de o alrededor de 1 M.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el pH de la solución de lavado es superior a 8.0.
- 30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el pH de la solución de lavado está en un rango de aproximadamente 8.5-9.5.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el pH de la solución de lavado es 9.0.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el pH de la solución de lavado es al menos 8.5.
- 35 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que las impurezas comprenden especies de alto peso molecular (HMW).
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que las impurezas comprenden proteínas de la célula huésped (HCP).