

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 167**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012 PCT/EP2012/054449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12123488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012 E 12708546 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2686334**

54 Título: **Cromatografía de intercambio iónico con selectividad mejorada para la separación de monómeros, agregados y fragmentos polipeptídicos mediante la modulación de la fase móvil**

30 Prioridad:

16.03.2011 EP 11158523

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

23.02.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

NEUMANN, SEBASTIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 656 167 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

Cromatografía de intercambio iónico con selectividad mejorada para la separación de monómeros, agregados y fragmentos polipeptídicos mediante la modulación de la fase móvil

5 En el presente documento se informa de un procedimiento para separar monómeros, agregados y fragmentos de polipéptidos usando cromatografía de intercambio iónico, por el que en la etapa de recuperación se añaden un polímero no iónico y un aditivo a la fase móvil.

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas, y especialmente las inmunoglobulinas, desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Los polipéptidos para uso en aplicaciones farmacéuticas se producen principalmente en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6@ y similares.

Debido a sus propiedades químicas y físicas, tales como la masa molecular y la arquitectura de dominio que incluye modificaciones secundarias, el procesamiento posterior de las inmunoglobulinas es muy complicado. Por ejemplo, tanto en los medicamentos formulados como en los productos intermedios en el procesamiento posterior (DSP) se requieren soluciones concentradas para lograr bajos volúmenes que permitan una manipulación y almacenamiento de aplicaciones económicos. El procesamiento posterior de inmunoglobulinas producidas biotecnológicamente comprende típicamente tres etapas de cromatografía: una primera etapa de cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, Proteína A, para extraer moléculas que no son inmunoglobulinas, seguida de dos etapas de cromatografía de intercambio iónico. La inmunoglobulina purificada se obtiene en una solución a baja concentración que requiere una etapa de concentración antes de formular el anticuerpo en la formulación farmacéutica. Muchas proteínas, incluyendo las IgG, forman dímeros, oligómeros o agregados de orden superior. Para proporcionar un producto proteico terapéutico con la pureza requerida, estas especies moleculares se tienen que extraer mediante el procedimiento de purificación.

30 Diferentes procedimientos están bien establecidos y se utilizan ampliamente para la purificación de proteínas (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102). Zhou, J.X., et al. (J. Chrom. A 1175 (2007) 69-80) informan de una cromatografía de intercambio catiónico con gradiente híbrido de pH-conductividad para la purificación de anticuerpos monoclonales a escala industrial. La separación de monómeros de anticuerpos de sus multímeros mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico se describe en el documento EP 1 084 136. El documento US 5.429.746 se refiere a la aplicación de cromatografía de combinación de cromatografía de interacción hidrófoba a la purificación de proteínas de moléculas de anticuerpos.

La modulación del disolvente de la cromatografía en columna se describe en Arakawa, T., et al. en Prot. Pep. Lett. 15 (2008) 544-555. En el documento EP 1 729 867 se informa de un procedimiento para la purificación cromatográfica. La extracción de agregados de anticuerpos mediante cromatografía de hidroxapatita se describe en Gagnon, P. y Beam, K., en Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 440-446. En J. Immunol. Meth. (336 (2008) 222-228), Gagnon, P. informa de una extracción mejorada de agregados de anticuerpos por cromatografía de hidroxapatita en presencia de polietilenglicol. En el documento WO 2004/013162 se informa de una capacidad de unión dinámica incrementada en la cromatografía de intercambio iónico mediante la adición de polietilenglicol. En el documento WO 2005/094960 se informa de un procedimiento para la purificación cromatográfica. La capacidad y la purificación mejoradas de anticuerpos mediante cromatografía en modo mixto en presencia de polímeros orgánicos no iónicos solubles en agua se describe en el documento WO 2008/086335. En el documento WO 2009/149067 se informa de un procedimiento para la purificación de anticuerpos.

50 Milby, K.H., et al. informan de la cromatografía de intercambio iónico de proteínas y del efecto de polímeros neutros en la fase móvil (J. Chrom. 482 (1989) 133-144). En Biotechnology Techniques (12 (1998) 289-293), Feng, X-L., et al. informan de que el polietilenglicol mejora la purificación del factor de necrosis tumoral humano recombinante durante la cromatografía de intercambio iónico. Un procedimiento para obtener selectividades únicas en la cromatografía de intercambio iónico mediante la adición de polímeros orgánicos a la fase móvil es descrito por Gagnon, P., et al. (J. Chrom. 743 (1996) 51-55). Gagnon, P. informa en un artículo de Internet en validated.com (<http://www.validated.com/revalbio/pdf/ionslect.pdf>) de la puesta a punto de la selectividad en los intercambiadores de iones. En el documento WO 2009/149067 se informa de un procedimiento para la purificación de anticuerpos.

60 **Resumen de la invención**

Se ha encontrado que se pueden emplear altas concentraciones de PEG durante la cromatografía de intercambio catiónico en presencia de ciertos aditivos (potenciadores de la solubilidad) para modular la selectividad y mejorar la resolución del monómero de anticuerpo y de las especies agregadas, por ejemplo, en comparación con los procedimientos que emplean PEG solamente.

En el presente documento se informa de un procedimiento para aislar u obtener o producir un polipéptido de interés en forma monomérica a partir de otro(s) componente(s), tal como el polipéptido de interés en forma agregada, que comprende al menos una etapa cromatográfica. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una solución que comprende el polipéptido de interés con un material de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el contacto con el material de cromatografía tiene lugar en ausencia de un polímero no iónico y un aditivo, y en el que la recuperación tiene lugar en presencia de un polímero no iónico y un aditivo.

Se ha encontrado que, usando un aditivo adicional en un procedimiento del que se informa en el presente documento, se puede mejorar el efecto del polímero no iónico.

En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo en forma monomérica que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende un polímero no iónico y un aditivo a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido un anticuerpo, por la que el anticuerpo en forma monomérica permanece adsorbido sobre el material de cromatografía de intercambio iónico, y
- recuperar el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo el anticuerpo en forma monomérica.

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir una preparación de polipéptido con contenido reducido de proteína de célula hospedadora mediante el cual la preparación se obtiene de un sobrenadante de cultivo de células de mamífero, especialmente un sobrenadante de cultivo de células CHO, que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende un polímero no iónico y un aditivo a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido el polipéptido, por la que el polipéptido en forma monomérica permanece adsorbido sobre el material de cromatografía de intercambio iónico, y
- recuperar el polipéptido en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo la preparación de polipéptido con contenido reducido de proteína de célula hospedadora.

En el presente documento se informa de un procedimiento para determinar la concentración de un polímero no iónico y un aditivo para uso en una cromatografía de intercambio iónico de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- determinar en solución, en ausencia del aditivo, la concentración del polímero no iónico a la que menos del 50 % del polipéptido permanece en solución,
- determinar en solución, en presencia de una concentración del polímero no iónico que se ha determinado en la etapa previa, la concentración del aditivo a la que más del 95 % del polipéptido permanece en solución,

determinando de este modo la concentración de un polímero no iónico y un aditivo.

En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo en forma monomérica que comprende la siguiente etapa:

- recuperar el anticuerpo en forma monomérica de un material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo el anticuerpo en forma monomérica,

en el que la eficiencia de separación (resolución) de la cromatografía se mejora en comparación con una cromatografía en ausencia del polímero no iónico, y

en el que la concentración empleada del polímero no iónico daría como resultado una precipitación parcial o completa del anticuerpo en ausencia del aditivo.

En un modo de realización, el material de cromatografía de intercambio iónico no es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

El polímero no iónico se puede seleccionar del grupo que comprende poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros PEG-PPG y copolímeros tribloque compuestos de poli(oxipropileno) (poli(óxido de propileno)) flanqueado por poli(oxietileno) (poli(óxido de etileno)). En un modo de realización adicional, el polímero no iónico es poli(etilenglicol).

5 El aditivo se puede seleccionar del grupo que comprende zwitteriones, aminoácidos, urea, derivados de urea, anfolitos, CHAPSO, productos naturales, azúcares y polioles. En un modo de realización adicional, el aditivo es sorbitol.

10 El polímero no iónico puede tener una concentración de aproximadamente un 5 % a un 15 % en peso y/o el aditivo tiene una concentración de un 3 % a un 25 % en peso.

En un modo de realización, el polipéptido es un anticuerpo de clase IgG o IgD o IgE o IgA. En otro modo de realización, el polipéptido es un anticuerpo de clase IgG, subclase IgG1 o subclase IgG2 o subclase IgG3 o subclase IgG4.

15

En un modo de realización, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

20 - aplicar una primera solución que comprende opcionalmente un polímero no iónico y un aditivo a un material cromatográfico de intercambio iónico y equilibrar de este modo el material de cromatografía de intercambio iónico,

25 - aplicar una solución tamponada que comprende el polipéptido al material de cromatografía equilibrado y adsorber de ese modo el polipéptido sobre el material de cromatografía, por la que la solución está esencialmente libre de un polímero no iónico y un aditivo,

30 - aplicar una solución tamponada que comprende un polímero no iónico y un aditivo al material de cromatografía, por la que el polipéptido en forma monomérica permanece adsorbido sobre el material de cromatografía de intercambio iónico, y

- recuperar el polipéptido en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución.

35 En un modo de realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En un modo de realización se aplican aproximadamente 40 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía. En un modo de realización se aplican aproximadamente 30 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía. En un modo de realización se aplican aproximadamente 20 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía.

40 Un aspecto según se informa en el presente documento es un procedimiento para producir un anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica que comprende las siguientes etapas:

45 - aplicar una primera solución que comprende opcionalmente poli(etilenglicol) y sorbitol a un material cromatográfico de intercambio catiónico y equilibrar de ese modo el material,

- aplicar la solución que comprende el anticuerpo de la clase IgG al material de cromatografía equilibrado y cargar de este modo el material de cromatografía,

50 - producir el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica aplicando una solución al material cromatográfico que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol y desorbiendo/eluyendo de este modo el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica del material cromatográfico, por la que el polímero de poli(etilenglicol) tiene una concentración de un 10 % en peso y el sorbitol tiene una concentración de un 5 % a un 20 % en peso.

55 Otro aspecto según se informa en el presente documento es un procedimiento para producir un anticuerpo de la preparación de la clase IgG con contenido reducido de proteína de célula hospedadora que comprende las siguientes etapas:

60 - aplicar una primera solución que comprende opcionalmente poli(etilenglicol) y sorbitol a un material cromatográfico de intercambio catiónico y equilibrar de ese modo el material,

- aplicar la solución que comprende el anticuerpo de la clase IgG al material de cromatografía equilibrado y cargar de este modo el material de cromatografía,

65

- producir el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica aplicando una solución al material cromatográfico que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol y desorbiendo/eluyendo de este modo el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica del material cromatográfico, por la que el poli(etilenglicol) tiene una concentración de un 10 % en peso y el sorbitol tiene una concentración de un 5 % a un 20 % en peso.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un polipéptido de interés en forma monomérica separándolo de otro(s) componente(s), tal como el polipéptido de interés en forma agregada, que comprende al menos una etapa cromatográfica. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una solución que comprende el polipéptido de interés y un material de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el contacto con el material de cromatografía tiene lugar en ausencia de un polímero no iónico y un aditivo, y en el que la recuperación tiene lugar en presencia de un polímero no iónico y un aditivo.

Se ha encontrado que la presencia de un polímero no iónico y un aditivo aumenta la diferencia en el tiempo de retención (resolución) de un polipéptido en forma monomérica en comparación con el polipéptido en forma agregada en un material de cromatografía de intercambio catiónico, permitiendo de este modo una nueva selectividad para mejorar la extracción de un polipéptido en forma agregada del polipéptido en forma monomérica.

Especialmente, se ha encontrado que se pueden emplear altas concentraciones de PEG durante la cromatografía de intercambio catiónico en presencia de ciertos aditivos (potenciadores de la solubilidad) para modular la selectividad y mejorar la resolución del monómero de anticuerpo y de las especies agregadas, por ejemplo, en comparación con los procedimientos que emplean PEG solamente.

El poli(etilenglicol) es viscoso y las altas viscosidades de los tampones de migración en aplicaciones cromatográficas dan lugar a ciertas limitaciones prácticas durante las aplicaciones cromatográficas.

Un procedimiento de separación cromatográfica se puede caracterizar por la resolución de los picos individuales del cromatograma de elución. El valor de la resolución se puede calcular de acuerdo con Kaltenbrunner, O., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 201-210, o Grushka, E., *Anal. Chem.* 44 (1972) 1733-1738.

Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Heftmann, E., (ed.), *Chromatography*, 5.^a edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); Deyl, Z., (ed.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Vol. 60, Elsevier Science BV, Ámsterdam, Países Bajos, (1998); Poole, C.F., y Poole, S.K., *Chromatography Today*, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer Verlag (1982); Sambrook, J. et al., (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); o Ausubel, F.M. et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1998).

Un «polipéptido» es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos se denominan «péptidos». Una «proteína» es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas o al menos una cadena polipeptídica de más de 100 residuos de aminoácidos. Un polipéptido también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los grupos carbohidrato y otros sustituyentes no se peptídicos pueden a un polipéptido por la célula en la que se produce el polipéptido, y variarán con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; los sustituyentes, tales como los grupos carbohidrato en general no se especifican, pero pueden estar presentes de todos modos.

El término «aplicar a» denota una etapa parcial de un procedimiento de purificación en la que una solución se pone en contacto con un material de cromatografía. Esto denota que a) la solución se añade a un dispositivo cromatográfico en el que está contenido el material de cromatografía, o b) que el material de cromatografía se añade a una solución que comprende el polipéptido. En el caso a), la solución pasa a través del dispositivo permitiendo la adsorción de las sustancias contenidas en la solución sobre el material de cromatografía. Dependiendo de las condiciones, tales como, por ejemplo, pH, conductividad, concentración de sal, temperatura y/o caudal, algunas sustancias de la solución se adsorben sobre el material de cromatografía y otras sustancias se pueden recuperar de la fracción no adsorbida. La «fracción no adsorbida» denota la solución obtenida después del paso del dispositivo, que puede ser la solución aplicada o una solución tamponada, que se usa para lavar la columna o para provocar la elución de sustancias adsorbidas sobre el material de cromatografía. En un modo de realización, el dispositivo es una columna o un casete. En el caso b), el material de cromatografía se puede añadir, por ejemplo, como un sólido, a la solución, por ejemplo, que contiene la sustancia de interés que se va a purificar, permitiendo una interacción entre el material de cromatografía y las sustancias en solución. Después de la interacción, el material de cromatografía se extrae, por ejemplo, por filtración, y la sustancia unida

al material de cromatografía también se extrae con este de la solución, mientras que las sustancias no unidas al material de cromatografía permanecen en solución. En un modo de realización se adsorben aproximadamente 40 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía. En un modo de realización se adsorben aproximadamente 30 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía. En un modo de realización, se adsorben aproximadamente 20 g de polipéptido (anticuerpo) por litro de material de cromatografía.

El término «modo de unión y elución» denota un modo de funcionamiento de una etapa de cromatografía, en la que se aplica una solución que contiene una sustancia de interés que se va a purificar a un material de cromatografía, por el que la sustancia de interés se une al material de cromatografía. Por lo tanto, la sustancia de interés queda retenida en el material de cromatografía, mientras que las sustancias que no son de interés se eliminan con la fracción no adsorbida o el sobrenadante. La sustancia de interés se recupera después del material de cromatografía en una segunda etapa con una solución de elución. En un modo de realización, el procedimiento del que se informa en el presente documento se realiza en modo de unión y elución.

Las soluciones empleadas en el procedimiento del que se informa en el presente documento son soluciones brutas o tamponadas. El término «solución tamponada» denota una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o alcalinas se equilibran mediante la sustancia tampón disuelta. Se puede usar cualquier sustancia tampón con dichas propiedades. En general, se usan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables. En un modo de realización, la solución tamponada se selecciona entre una solución tamponada con fosfato que consiste en ácido fosfórico y/o sales del mismo, o una solución tamponada con acetato que consiste en ácido acético y sales del mismo, o una solución tamponada con citrato que consiste en ácido cítrico y/o sales del mismo, o una solución tamponada con morfolina, o una solución tamponada con 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, o una solución tamponada con histidina, o una solución tamponada con glicina o una solución tamponada con tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). En otro modo de realización, la solución tampón se selecciona entre una solución tamponada con fosfato, o una solución tamponada con acetato, o una solución tamponada con citrato o una solución tamponada con histidina. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio.

Los términos «elución continua» y «procedimiento de elución continua» denotan un procedimiento en el que la conductividad de una solución que causa elución, es decir, la recuperación de un compuesto unido de un material de cromatografía, se cambia, es decir, se aumenta o disminuye, de forma continua, es decir, la concentración se cambia por una secuencia de pequeñas etapas cada una no mayor que un cambio de un 2 %, o de un 1 % de la concentración de la sustancia que causa elución. En esta «elución continua», una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de la fase móvil se pueden cambiar de forma lineal o exponencial o asintótica. En un modo de realización, el cambio es lineal.

El término «elución por etapas» denota un procedimiento en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que causa elución, es decir, la recuperación de una sustancia unida de un material de cromatografía, se aumenta o disminuye de una vez, es decir, directamente desde un valor/nivel al siguiente valor/nivel. En esta «elución por etapas», una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de una cromatografía, se pueden cambiar todas a la vez desde un primer valor, por ejemplo, inicial, a un segundo valor, por ejemplo, final. Por lo tanto, las condiciones se cambian incrementalmente, es decir, paso a paso, a diferencia de lo que sucede en un cambio lineal.

El término «material de cromatografía de intercambio iónico» denota una matriz inmóvil de alta masa molecular que lleva sustituyentes cargados unidos covalentemente usada como fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico. Para la neutralidad de la carga global, los contraiones no unidos covalentemente se unen a la misma. El «material de cromatografía de intercambio iónico» tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos covalentemente por iones cargados de manera similar de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, la «resina de intercambio iónico» se denomina resina de intercambio catiónico o resina de intercambio aniónico. Dependiendo de la naturaleza del grupo cargado (sustituyente), la «resina de intercambio iónico» se denomina, por ejemplo, en el caso de resinas de intercambio catiónico, resina de ácido sulfónico (S) o resina de sulfopropilo (SP) o resina de carboximetilo (CM).

Diferentes tipos de materiales de intercambio iónico, es decir, fases estacionarias, están disponibles bajo diferentes nombres y de una multitud de empresas tales como, por ejemplo, materiales de intercambio catiónico Bio-Rex® (por ejemplo, tipo 70), Chelex® (por ejemplo, tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo, tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo, tipo 50W, MP), todos disponibles de BioRad Laboratories, WCX 2 disponible de Ciphergen, Dowex® MAC-3 disponible de Dow Chemical Company, Mustang C y Mustang S disponibles de Pall Corporation, Cellulose CM (por ejemplo, tipo 23, 52), hyper-D, partisphere disponible de Whatman plc., Amberlite® IRC (por ejemplo, tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo, tipo SP, CM, 650M) todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, CM 1500 y CM 3000 disponibles de BioChrom Labs, SP-Sepharose™, CM-Sepharose™ disponibles de GE Healthcare, resinas Poros disponibles de Applied Biosystems o PerSeptive Biosystems, Asahipak ES (por ejemplo, tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo, tipo 825, 2825,

5025, LG), IEC SP (por ejemplo, tipo 420N, 825), IEC QA (por ejemplo, tipo LG, 825) disponible de Shoko America Inc., resina de intercambio catiónico 50W disponible de Eichrom Technologies Inc. En un modo de realización, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico fuerte, tal como Macro-Prep® High S o 25S, o MacroCap SP, o Toyopearl® SP 650M, o Source S, o SP Sepharose, o POLYCAT A, o Mono S o Highscreen SP.

El término «en condiciones adecuadas para la unión» y los equivalentes gramaticales del mismo denotan que una sustancia de interés, por ejemplo, un anticuerpo en forma monomérica, se une a una fase estacionaria cuando se pone en contacto con ella, por ejemplo, un material de intercambio iónico. Esto no significa necesariamente que el 100 % de la sustancia de interés se una, sino que esencialmente el 100 % de la sustancia de interés se une, es decir, al menos un 50 % de la sustancia de interés se une, en un modo de realización al menos un 75 % de la sustancia de interés se une, en otro modo de realización al menos un 85 % de la sustancia de interés se une, en un modo de realización adicional, más de un 95 % de la sustancia de interés se une a la fase estacionaria.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico. El término «anticuerpo terapéutico» designa un anticuerpo que se prueba en estudios clínicos para su aprobación como agente terapéutico en seres humanos y que se pueda administrar a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad. En otro modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización adicional, el anticuerpo terapéutico se obtiene de un gran simio o de un animal transformado con un locus de anticuerpo humano o un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado. En un modo de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humano. En un modo de realización adicional, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal humanizado. Los anticuerpos terapéuticos se utilizan ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo, neoplasias malignas hematológicas y sólidas, incluyendo linfoma no Hodgkin, cáncer de mama y cáncer colorrectal), enfermedades inmunitarias, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades vasculares o enfermedades infecciosas. Dichos anticuerpos son, en un modo de realización, anticuerpos contra ALK, receptores de cinasas relacionados con la adhesión (por ejemplo, Axl) o receptores de ERBB (por ejemplo, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4), o receptores hepatocelulares productores de eritropoyetina (EPH) (por ejemplo, EphA1; EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB5, EphB6) o receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5), o Fgr, o IGF-1R, o receptor de insulina, o LTK, o M-CSFR, o MUSK, o receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGFR-A, PDGFR-B), o RET, o ROR1, o ROR2, o ROS, o RYK, o receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGF-R1/FLT1, VEGF-R2/FLK1, VEGF3) o receptores tirosina-cinásicos con dominios similares a inmunoglobulinas y similares a EGF (TIE) (por ejemplo, TIE-1, TIE-2/TEK), o Tec, o TYRO10, o receptores del factor de crecimiento insulinoide (IGF) (por ejemplo, INS-R, IGF-IR, IR-R) o receptores con dominio discoidina (DD) (por ejemplo, DDR1, DDR2) o receptor para c-Met (MET) o *recepteur d'origine nantais* (RON, también conocido como receptor 1 estimulante de macrófagos), o receptor de FLT3 (tirosina cinasa 3 relacionada con FMS), o receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1), o receptor de c-kit (KIT o SCF-R) o receptores relacionados con receptores de insulina (IRR), o CD19, o CD20, o HLA-DR, o CD33, o CD52, o G250, o GD3, o PSMA, o CD56, o CEA, o antígeno de Lewis Y, o receptor de IL-6.

El término «anticuerpo» abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpo, incluyendo anticuerpos enteros. El anticuerpo es, en un modo de realización, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo empobrecido para antígenos de linfocitos T. La ingeniería genética de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238; el documento US 5.204.244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase a la que pertenece un anticuerpo, las regiones constantes de la cadena pesada de los anticuerpos se denominan α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE) e γ (IgG), respectivamente. El término «anticuerpo de clase IgG1 humana», por ejemplo, denota un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes se deriva de la secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana. El término incluye anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y conjugados de anticuerpos.

El término «anticuerpo completo» denota un anticuerpo que comprende dos polipéptidos de cadena ligera (cadenas ligeras) y dos polipéptidos de cadena pesada (cadenas pesadas). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera contiene un dominio variable (región variable, en general, la parte aminoterminal) que comprende regiones de unión que son capaces de interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera también comprende una región constante (en general, la parte carboxiterninal). El dominio variable de una cadena ligera o pesada comprende a su vez segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

El término «conjugado de anticuerpo» designa un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo conjugada a través de un enlace peptídico a un polipéptido adicional. El polipéptido adicional puede ser un péptido distinto de un anticuerpo, tal como una hormona, o una toxina, o un receptor de crecimiento, o un péptido antifusogénico, o un factor del complemento o similar.

5 Para la purificación de anticuerpos producidos de forma recombinante se puede emplear una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. En general, una cromatografía de afinidad con proteína A va seguida por una o dos etapas de separación adicionales. La etapa final de purificación es una denominada «etapa de pulido» para la eliminación de impurezas traza y contaminantes como anticuerpos agregados, HCP
10 (proteína de la célula hospedadora) residual, ADN (ácido nucleico de la célula hospedadora), virus o endotoxinas.

15 El término «anticuerpo en forma monomérica» denota una molécula de anticuerpo que no está asociada a una segunda molécula de anticuerpo, es decir, que no está unida de forma covalente ni de forma no covalente a otra molécula de anticuerpo. El término «anticuerpo en forma agregada» indica una molécula de anticuerpo que está asociada, ya sea de forma covalente o no covalente, a al menos una molécula de anticuerpo adicional, y que se eluye como un único pico en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. El término «en forma monomérica», como se usa en el presente documento, no necesariamente denota que el 100 % de una molécula de anticuerpo está presente en forma monomérica. Denota que un anticuerpo está esencialmente en forma
20 monomérica, es decir, al menos un 90 % del anticuerpo está en forma monomérica, en un modo de realización al menos un 95 % del anticuerpo está en forma monomérica, en otro modo de realización al menos un 99 % del anticuerpo está en forma monomérica, en un modo de realización adicional, al menos un 99,5 % del anticuerpo está en forma monomérica, y en un modo de realización más de un 99,8 % del anticuerpo está en forma monomérica, determinada como el área del pico de un cromatograma de exclusión por tamaño. El término
25 «forma de alta masa molecular (HMW)» denota el anticuerpo polimérico, es decir, agregado, por el que este agregado todavía es soluble en una solución acuosa tamponada.

30 El término «100 %», como se usa en el presente documento, denota que la cantidad de componentes distintos de un componente especificado está por debajo del límite de detección del procedimiento analítico referido en las condiciones especificadas.

35 Los términos «90 %», «95 %», «99 %», «99,5 %» y «99,8 %», como se usan en la presente solicitud, no denotan valores exactos, sino valores dentro de la exactitud del procedimiento analítico referido en las condiciones especificadas.

40 El término «compuesto de elución» denota una sal usada para recuperar un polipéptido unido de un material de intercambio iónico, por la que el compuesto aumenta la conductividad del tampón/solución. Esto se puede lograr mediante una mayor concentración de sal tampón o mediante la adición de otras sales, denominadas sales de elución, a la solución tamponada. Las sales de elución preferentes son citrato de sodio, cloruro de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, así como otras sales de ácido cítrico y fosfórico, y cualquier mezcla de estos componentes. En un modo de realización, el compuesto de elución se selecciona entre citrato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y mezclas de los mismos.

45 Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias parciales derivadas de un anticuerpo no humano y de un anticuerpo humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados se derivan de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor), en el que los residuos de una región hipervariable se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo, oveja, cobaya o primate no humano, que tiene la especificidad y afinidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) del anticuerpo humano se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender modificaciones adicionales, por ejemplo, residuos de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones dan lugar a variantes de dicho anticuerpo receptor o donante, que son homólogas pero no idénticas a la secuencia original correspondiente. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo.
50

55 En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, al menos uno y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de un anticuerpo donante no humano, y todas o sustancialmente todas las FR son las de un anticuerpo receptor humano. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de un anticuerpo, típicamente la de un anticuerpo humano.
60

65 En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la región estructural se han sustituido por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores o primates no humanos.

El término «anticuerpo monoclonal», como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes sitios antigénicos (determinantes o epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único sitio antigénico en un antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos, ya que se pueden sintetizar sin contaminarse con otros anticuerpos. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

El término «anticuerpo quimérico» denota un anticuerpo que comprende un dominio variable, es decir, una región de unión, de una primera especie y al menos una parte de una región constante derivada de una segunda especie diferente.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas de anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que al constructo final posea las mismas propiedades de unión al antígeno que el anticuerpo original.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de «sustituciones preferentes». Los cambios más sustanciales se proporcionan en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de «sustituciones ejemplares» y como se describe a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en las cadenas de anticuerpos y los productos se pueden cribar para la conservación de la actividad biológica del anticuerpo original.

Tabla

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

5 Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 El término «fase móvil» denota cualquier mezcla de agua y/o tampón acuoso y/o disolventes orgánicos que sea adecuada para recuperar polipéptidos de una columna de cromatografía. El término «eluir» o «elución», respectivamente, en el presente contexto se usa como conoce el experto en la técnica y denota la disolución, opcionalmente el desplazamiento, de sustancia(s) adsorbida(s) de sólidos o adsorbentes, que se impregnan con fluidos, es decir, el material de la columna sobre el que se adsorbe(n) la(s) sustancia(s).

15 El término «adsorción» denota la acumulación de sustancias de un líquido, por ejemplo, una fase móvil, en la fase límite formada entre el líquido y una fase sólida, en la que esta última puede adsorber las sustancias de interés en su superficie. Esta adsorción da lugar a una acumulación de las sustancias adsorbidas. La sustancia que puede acumular la sustancia de interés en su superficie se denomina adsorbente y el material adsorbido se denomina adsorbato. El término adsorción habitualmente se distingue del término «absorción», que aparte de la acumulación en una superficie también se refiere a la penetración de las sustancias acumuladas en el interior del sólido o fluido adsorbente. En general, la adsorción es un proceso físico en el que las sustancias, habitualmente moléculas, se adhieren a una superficie del adsorbente y, por lo tanto, se acumulan en la superficie respectiva. Las fuerzas que son responsables de esta adherencia se consideran fuerzas físicas en lugar de enlaces químicos y, por lo tanto, la adsorción también se conoce en la técnica como adsorción física o fisiorción, que no excluye necesariamente la unión química de sustancias a la superficie. Las fuerzas físicas que intervienen en la adsorción de sustancias sobre una superficie son, en la mayoría de los casos, fuerzas de Van der Waals, fuerzas de London o interacciones dipolo/dipolo, por ejemplo enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo inducido, en las que estos términos se usan como se explican en el presente documento o como normalmente se usan en contexto con adsorción.

20 25 30 En cromatografía (en columna) habitualmente se usan disolventes como eluyente, es decir, agente eluyente en el que la(s) sustancia(s) que se ha(n) de eluir es(son) al menos suficientemente soluble(s).

35 En un modo de realización, el polímero no iónico es un polímero no iónico hidrófilo. El polímero se puede seleccionar entre poliéter no iónico, tal como poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de bloque PEG-PPG, copolímeros PEG-PPG, copolímeros tribloque compuestos de poli(oxipropileno) (poli(óxido de propileno)) y dos polímeros de poli(oxietileno) (poli(óxido de etileno)) (Poloxamer, Pluronic™) y otros polímeros tribloque PEG-PPG-PEG.

40 El polímero no iónico empleado se puede caracterizar, además de por su bloque de construcción monomérico, por su masa molecular dada en Daltons (Da). El término «masa molecular» denota con respecto a los polímeros la masa molecular media del polímero, ya que los compuestos poliméricos no se obtienen con una masa molecular definida sino que, de hecho, tienen una distribución de masas moleculares. La masa molecular de un polímero se da en la forma «aproximadamente X Da», por lo que «X» denota el valor medio de la masa molecular del polímero. El término «aproximadamente» indica que, en la preparación del polímero, algunas moléculas tendrán una masa mayor y algunas moléculas tendrán una masa menor que la masa molecular media indicada, es decir, el término aproximadamente se refiere a una distribución de masas moleculares en la que un 95 % de las moléculas de polímero tienen una masa molecular dentro de +/-30 % de la masa molecular indicada. Por ejemplo, una masa molecular de 3500 Da denota un intervalo de 2450 kDa a 4550 Da. En un modo de realización, las moléculas de polímero tienen una masa molecular dentro de +/-20 % de la masa molecular indicada. En un modo de realización, las moléculas de polímero tienen una masa molecular dentro de +/-10 % de la masa molecular indicada.

45 50 55 El polímero no iónico puede estar presente en una solución tamponada, tal como una solución tamponada que contiene sal. La solución que comprende el polipéptido de interés se puede obtener directamente del sobrenadante de cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido. El sobrenadante puede ser un sobrenadante de cultivo clarificado o no clarificado.

60 En un modo de realización, uno o más polímeros no iónicos están presentes en la solución aplicada al material de cromatografía para recuperar el polipéptido, especialmente el anticuerpo. En un modo de realización, la solución aplicada al material de cromatografía para recuperar el anticuerpo en forma monomérica comprende uno, o dos, o tres, o cuatro o cinco polímeros no iónicos diferentes. Si más de un polímero no iónico está presente en la solución, la suma de las concentraciones de todos los polímeros no iónicos presentes en la solución está preferentemente dentro del intervalo que se da en el presente documento.

65 En un modo de realización, uno o más aditivos están presentes en la solución aplicada al material de cromatografía para recuperar el polipéptido, especialmente el anticuerpo. En un modo de realización, la solución

aplicada al material de cromatografía para recuperar el anticuerpo en forma monomérica comprende uno, o dos, o tres, o cuatro o cinco aditivos diferentes. Si más de un aditivo está presente en la solución, la suma de las concentraciones de todos los aditivos presentes en la solución está preferentemente dentro del intervalo que se da en el presente documento.

5 De forma alternativa, la solución que comprende el polipéptido de interés puede ser el eluido de una etapa de cromatografía precedente.

10 Las interacciones entre el polipéptido de interés y el material de cromatografía de intercambio iónico pueden ser adsorción, es decir, unión del polipéptido, o un retraso del polipéptido en relación con otro(s) componente(s) también presente(s) en la solución.

15 Para recuperar un polipéptido en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico, la adsorción va seguida por una etapa de elución del polipéptido adsorbido de interés en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico. La elución del polipéptido adsorbido se puede efectuar mediante el cambio de las condiciones de la sal, es decir, la conductividad, y/o el valor de pH en comparación con la etapa de adsorción.

20 Con la excepción de la adición de un polímero no iónico y un aditivo a las fases móviles durante la recuperación o elución del polipéptido de interés del material de cromatografía de intercambio iónico, las etapas de cromatografía del procedimiento del que se informa en el presente documento se realizan de acuerdo con condiciones de funcionamiento generales convencionales y principios bien conocidos en la técnica. Se usan convenientemente columnas de cromatografía convencionales, cuyo tamaño se adapta para cada caso, como lo son los materiales de partida, tampones, matrices, incluidos los grupos funcionales de los ligandos, etc.

25 La carga de un polipéptido se puede cambiar variando el valor de pH de la solución circundante. Es bien sabido que un material de intercambio iónico puede ser un material de intercambio iónico fuerte, lo que significa que se carga a todos los valores de pH, o un material de intercambio iónico débil, lo que significa que puede cargarse al variar el pH.

30 Se demostró inesperadamente que la adición de un polímero no iónico y un aditivo a la fase móvil en una etapa de recuperación de cromatografía de intercambio iónico de la que se informa en el presente documento aumenta el rendimiento del polipéptido en forma monomérica, en comparación con la cromatografía de intercambio iónico convencional. La cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio catiónico. La concentración del polímero no iónico es al menos aproximadamente un 5 % en peso y la concentración del aditivo es al menos un 3 % en peso.

35 En general, no hay exclusiones por masa molecular para el polímero no iónico usado en el procedimiento del que se informa en el presente documento. La masa molecular del polímero no iónico se elige de manera que sea lo más baja posible mientras da como resultado, en combinación con el aditivo, un aumento del rendimiento del polipéptido en forma monomérica en comparación con el uso del polímero no iónico solo. El experto en la técnica sabe que la adición de cualquier sustancia, es decir, del polímero no iónico y el aditivo, afecta a (aumenta) la viscosidad de la solución resultante. Por lo tanto, un experto en la técnica apreciará que, debido a las propiedades fisicoquímicas del polímero no iónico y del aditivo, existe un límite superior para la adición de estos compuestos.

40 El polímero no iónico utilizado como en el procedimiento del que se informa en el presente documento comprende grupos que son ricos en átomos de oxígeno. En un modo de realización, el polímero no iónico es un polímero lineal o ramificado no cargado soluble en agua. Dichos polímeros no iónicos pueden ser poliéter, tales como poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de bloque PEG-PPG, copolímeros PEG-PPG, copolímeros tribloque compuestos por una cadena hidrófoba central de poli(oxipropileno) (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de poli(oxietileno) (poli(óxido de etileno)) (Poloxamer, Pluronic™) y otros polímeros tribloque PEG-PPG-PEG, etilhidroxietilcelulosa (EHEC) y similares polímeros, éter alilglicídico polimerizado, éter fenilglicídico polimerizado, dextrano, almidón, celulosa, polivinilpirrolidona y diversos tensioactivos y otros compuestos que comprenden estos bloques de construcción. El polímero no iónico es poli(etilenglicol) (PEG). El término poli(etilenglicol) también comprende poli(etilenglicoles) que han sido modificados.

55 Se puede usar cualquier polímero no iónico de cualquier masa molecular en el procedimiento del que se informa en el presente documento. Sin embargo, la concentración óptima y la relación entre el polímero no iónico y el aditivo pueden variar para cada proteína y, en la mayoría de los casos, hay una masa molecular preferente del polímero no iónico y una relación preferente entre el polímero no iónico y el aditivo

60 El polímero no iónico es poli(etilenglicol).

65

5 El poli(etilenglicol) se puede usar como un polipéptido no iónico modelo general para el comportamiento de polímeros no iónicos dentro del procedimiento del que se informa en el presente documento. Por lo tanto, aunque se usa poli(etilenglicol) como ejemplo en el presente documento, se debe tener en cuenta que la información proporcionada también se aplica a otros polímeros no iónicos, incluyendo los específicamente enumerados anteriormente en el presente documento.

10 El poli(etilenglicol) está disponible de varias fuentes comerciales. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 40 000 Da. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 400 Da y aproximadamente 10 000 Da. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 1000 Da y aproximadamente 8000 Da. En otros modos de realización se utiliza una mezcla de poli(etilenglicoles) de diferentes tamaños.

15 En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 2.450 Da y aproximadamente 4.550 Da. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 2.625 Da y aproximadamente 4.375 Da. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 2.800 Da y aproximadamente 4.200 Da. En un modo de realización, el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular entre aproximadamente 3.150 Da y aproximadamente 3.850 Da.

20 En un modo de realización, el poli(etilenglicol) es un poli(etilenglicol) lineal o ramificado.

Los poli(etilenglicoles) de menor masa molecular pueden requerir una mayor concentración másica para usarlos con el fin de tener un efecto similar en comparación con los poli(etilenglicoles) de mayor masa molecular.

25 Asimismo, se pueden emplear concentraciones menores de un poli(etilenglicol) de una masa molecular especificada para producir un polipéptido mayor en forma monomérica, tal como anticuerpos y proteínas de fusión, en comparación con las concentraciones requeridas para obtener la misma pureza de polipéptidos más pequeños. Por ejemplo, un anticuerpo de la clase IgA, que está presente principalmente como un dímero, que tiene una masa molecular de aproximadamente 320 kDa, requerirá una menor concentración de poli(etilenglicol) en comparación con un anticuerpo de la clase IgG que tiene una masa molecular de aproximadamente 150 kDa. La retención de agregados, complejos y otras moléculas grandes se puede incrementar más en general en comparación con la del polipéptido monomérico. También se puede requerir una menor concentración de poli(etilenglicol) para aumentar la retención de polipéptidos que interactúan con o son fuertemente adsorbidos sobre el material de cromatografía de intercambio catiónico en comparación con la concentración requerida de poli(etilenglicol) necesaria para aumentar la adsorción de polipéptidos que normalmente se adsorben débilmente sobre el material de cromatografía de intercambio catiónico.

40 El aditivo es una sustancia que puede reducir o incluso evitar la precipitación inducida por la presencia del polímero no iónico.

En un modo de realización, el aditivo tiene una conductividad que es suficientemente baja para no interferir con una cromatografía de intercambio catiónico. En otro modo de realización, el aditivo no tiene capacidad de tamponamiento detectable.

45 El aditivo puede ser un zwitterión, o un aminoácido (tal como glicina, bicina, tricina, alanina, prolina, betaína), o urea, o un derivado de urea (tal como alquilureas (metilurea, etilurea, etc.)), o alquilenglicoles (tal como etilenglicol o propilenglicol), o un anfolito (tal como tampones a base de ácido aminosulfónico MES, MOPS, HEPES, PIPES y tampón CAPS), o CHAPSO, o un producto natural (tal como ciertos alcaloides y betaínas), o un azúcar (tal como glucosa, sacarosa, rafinosa) o un poliol (tal como glicerol o xilitol o sorbitol).

50 El aditivo puede ser un poliol. El poliol puede ser glicerol o xilitol o sorbitol.

Para cualquier aditivo, se debe tener en cuenta que se debe considerar el límite de solubilidad individual al determinar la cantidad o concentración respectivas empleadas.

55 Si se utiliza un aminoácido como aditivo, se debe tener en cuenta que una cadena lateral cargada requerirá el uso de ácido o base adicional para ajustar el valor del pH de la solución. Mediante la adición de ácido o base excedente, se cambia la fuerza iónica de la fase móvil, lo que, a su vez, podría influir en el resultado de la cromatografía.

60 Por ejemplo, la glicina se puede usar como aditivo en el procedimiento del que se informa en el presente documento. La glicina es un compuesto zwitteriónico, más precisamente, la glicina es un aminoácido. A los valores de pH empleados en general en los procedimientos de cromatografía de intercambio catiónico, la glicina no contribuye a la conductividad global y, por lo tanto, no debería interferir en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico. Además, la glicina no muestra un efecto tamponante en solución acuosa, por lo que tampoco afectará al valor del pH de la fase móvil. La glicina se puede usar+ como aditivo en el procedimiento del

que se informa en el presente documento en una concentración de aproximadamente 50 mM a 5 M. La glicina puede tener una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 4 M. La glicina puede tener una concentración de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 3 M. La glicina puede tener una concentración de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 2 M. La glicina puede tener una concentración de aproximadamente 1 M. Si se usa más de un aditivo, las concentraciones de los aditivos individuales pueden ser menores que las proporcionadas como ejemplo en el párrafo anterior.

Debe señalarse que cualquier aditivo se puede usar a una concentración que es mayor que la concentración necesaria para lograr el efecto deseado. Especialmente un experto en la técnica puede determinar el intervalo de concentración de aditivos en el sentido de que el efecto está presente y que se puede tolerar en el procedimiento del que se informa en el presente documento.

Cuando el aditivo es urea o un derivado de urea, el aditivo está presente en una concentración de hasta 6 molar. En un modo de realización, el aditivo está presente en una concentración por debajo de 2 molar.

Como se ha descrito anteriormente, la concentración del polímero no iónico y del aditivo en la solución de recuperación puede variar. En general, se puede usar cualquier concentración de poli(etilenglicol). La concentración de poli(etilenglicol) es al menos aproximadamente un 0,5 % en peso.

La concentración del polímero no iónico se puede mantener constante o se puede variar durante el transcurso de la cromatografía. Este cambio incluye, pero sin limitación, un gradiente de concentración creciente o decreciente, o con cambios graduales en la concentración.

El polímero no iónico puede tener una concentración de aproximadamente un 7 % a un 13 % en peso y/o el aditivo puede tener una concentración de un 3 % a un 25 % en peso.

El uso o la adición de un polímero no iónico dan como resultado una reducción de la solubilidad de un polipéptido, especialmente de un anticuerpo, concomitantemente presente en esta solución. En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (5 mg/ml) como un polipéptido ejemplar a temperatura ambiente (TA) y a 4 °C sobre la concentración de poli(etilenglicol) 3500 Da añadido (malonato de sodio 50 mM, NaCl 90 mM, pH 6,5).

Tabla

Concentración de PEG	TA: conc. proteína (UV280) [mg/ml]	TA: conc. proteína [fracción de conc. inicial]	4 °C: conc. proteína (UV280) [mg/ml]	4 °C: conc. proteína [fracción de conc. inicial]
0 %	5,0	100 %	5,1	100 %
1%	5,1	100 %	5,1	100 %
2,5 %	5,1	100 %	5,1	100 %
5,0 %	5,1	100 %	5,8	100 %
7,5 %	5,0	100 %	2,1	42 %
10 %	2,5	50 %	0,5	10 %

En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (5 mg/ml) como un polipéptido ejemplar a temperatura ambiente y a 4 °C sobre la concentración de cloruro de sodio añadido (malonato de sodio 50 mM, 7,5 % en peso de poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 6,5).

Tabla

Concentración de NaCl	TA: conc. proteína (UV280) [mg/ml]	TA: conc. proteína [fracción de conc. inicial]	4 °C: conc. proteína (UV280) [mg/ml]	4 °C: conc. proteína [fracción de conc. inicial]
0 mM	2,9	61 %	0,7	14 %
45 mM	3,3	67 %	0,8	17 %
90 mM	3,6	75 %	0,9	19 %
135 mM	4,0	83 %	1,0	20 %
180 mM	4,6	95 %	1,6	33 %

El polímero no iónico es poli(etilenglicol) y el aditivo es un poliol. En la Figura 3 se muestra la solubilidad de un anticuerpo en una solución que comprende poli(etilenglicol) de una masa molecular de aproximadamente

3500 Da a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes polioles en concentraciones variables como aditivo.

5 En la Figura 4 se muestra la solubilidad de un anticuerpo en una solución que comprende poli(etilenglicol) con una masa molecular de aproximadamente 3500 Da a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes aminoácidos en concentraciones variables como aditivo.

10 En la Figura 5 se muestra la solubilidad de un anticuerpo en una solución que comprende poli(etilenglicol) con una masa molecular de aproximadamente 3500 Da a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes azúcares en concentraciones variables como aditivo.

Como se puede ver a partir de la siguiente tabla, las separaciones en presencia de solo el aditivo no proporcionan una mejora en el valor de la resolución.

15 **Tabla**

valor de resolución	anticuerpo anti-IL17	anticuerpo anti-CSF-1R
Ninguno	0,46	0,64
Glicina	0,52	0,61
Glutamato	0,49	0,68
Arginina	0,53	0,73
Glicerina	0,49	0,68
Urea	0,46	0,66
Manitol	0,46	0,69
Sacarosa	0,46	0,39
Trehalosa	0,45	0,60

El término «poliol» denota un compuesto que tiene al menos tres grupos hidroxilo, es decir, es un triol.

20 La reducción de la solubilidad mediante la adición de un polímero no iónico, por ejemplo, poli(etilenglicol), se puede evitar mediante la adición de un aditivo, por ejemplo, sorbitol.

25 Por lo tanto, en el presente documento se informa de un procedimiento para determinar la concentración de un polímero no iónico y un aditivo para uso en una cromatografía de intercambio iónico de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- determinar en solución, en ausencia del aditivo, la concentración del polímero no iónico a la que menos del 50 % del polipéptido permanece en solución,
- 30 - determinar en solución, en presencia de una concentración del polímero no iónico que se ha determinado en la etapa previa, la concentración del aditivo a la que más del 95 % del polipéptido permanece en solución,

35 determinando de este modo la concentración de un polímero no iónico y un aditivo.

40 En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) como un polipéptido ejemplar a temperatura ambiente sobre la concentración de sorbitol añadido como ejemplo de un aditivo también a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (citrate de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una masa molecular de aproximadamente 3500 Da, pH 5,0).

Tabla

aditivo (sorbitol) [% en peso]	cloruro de sodio [mM]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) [mg/ml]	conc. proteína [fracción de conc. inicial]
0	0	0	10,7	~ 100 %
0	0	5	10,6	~ 100 %
0	0	10	1,96	19,6 %
0	250	0	10,3	~ 100 %
0	250	5	10,6	~ 100 %
0	250	10	1,77	17,7 %
0	500	0	10,5	~ 100 %
0	500	5	10,6	~ 100 %

ES 2 656 167 T3

0	500	10	1,57	15,7 %
7,5	0	0	11,1	~ 100 %
7,5	0	5	10,6	~ 100 %
7,5	0	10	5,26	52,6 %
7,5	250	0	10,7	~ 100 %
7,5	250	5	10,6	~ 100 %
7,5	250	10	5,83	58,3 %
7,5	500	0	10,7	~ 100 %
7,5	500	5	10,6	~ 100 %
7,5	500	10	4,66	46,6 %
15	0	0	10,7	~ 100 %
15	0	5	10,8	~ 100 %
15	0	10	11,0	~ 100 %
15	250	0	10,8	~ 100 %
15	250	5	10,7	~ 100 %
15	250	10	10,4	~ 100 %
15	500	0	10,7	~ 100 %
15	500	5	10,6	~ 100 %
15	500	10	10,5	~ 100 %

En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de glicerol añadido como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

5

Tabla

aditivo (glicerol) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
0	0	9,65	96,5 %	9,82	98,2 %
0	5	10,0	100 %	10,0	100 %
0	10	2,13	21,3 %	0,59	5,9 %
7,5	0	9,76	97,6 %	9,96	99,6 %
7,5	5	9,88	98,8 %	10,2	~ 100 %
7,5	10	3,28	32,8 %	1,56	15,6 %
15	0	9,82	98,2 %	9,88	98,8 %
15	5	9,92	99,2 %	10,2	~ 100 %
15	10	6,70	67,0 %	3,04	30,4 %
20	0	9,95	99,5 %	10,2	~ 100 %
20	5	9,89	98,9 %	10,2	~ 100 %
20	10	8,46	84,6 %	5,54	55,4 %
25	0	10,3	~ 100 %	9,87	98,7 %
25	5	10,0	100 %	9,86	98,6 %
25	10	9,92	99,2 %	8,94	89,4 %
30	0	10,1	~ 100 %	9,77	97,7 %
30	5	9,92	99,2 %	10,1	~ 100 %
30	10	9,85	98,5 %	10,0	100 %

10 En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de xilitol añadido como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

15

Tabla

aditivo (xilitol) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
15	0	10,1	~ 100 %	10,2	~ 100 %
15	10	9,01	90,1 %	5,15	51,5 %
20	0	10,2	~ 100 %	10,1	~ 100 %
20	10	10,3	~ 100 %	10,1	~ 100 %

5 En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de glicina añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

Tabla

10

aditivo (glicina) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
0	0	9,82	98,2 %	9,94	99,4 %
0	5	10,0	100 %	10,0	100 %
0	10	1,60	16,0 %	0,53	5,3 %
1	0	9,85	98,5 %	9,72	97,2 %
1	10	3,80	38,0 %	1,49	14,9 %
2	0	9,73	97,3 %	9,83	98,3 %
2	10	7,18	71,8 %	3,19	31,9 %
4	0	9,84	98,4 %	9,77	97,7 %
4	5	9,96	99,6 %	10,1	~ 100 %
4	10	10,5	~ 100 %	9,71	97,1 %
8	0	9,89	98,9 %	9,95	99,5 %
8	5	9,87	98,7 %	9,94	99,4 %
8	10	9,90	99,0 %	11,3	~ 100 %

15 En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de prolina añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

Tabla

aditivo (prolina) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
1	0	9,74	97,4 %	9,75	97,5 %
1	10	3,86	38,6 %	1,63	16,3 %
2	0	9,78	97,8 %	9,99	99,9 %
2	10	8,38	83,8 %	3,61	36,1 %
4	0	9,93	99,3 %	10,0	100 %
4	10	9,85	98,5 %	10,1	> 100 %
8	0	9,98	99,8 %	10,1	> 100 %
8	10	10,1	> 100 %	10,2	> 100 %

En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de betaína añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

5

Tabla

aditivo (betaína) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
0	0	9,66	96,6 %	9,82	98,2 %
0	5	9,81	98,1 %	9,97	99,7 %
0	10	1,53	15,3 %	0,43	4,3 %
1	0	9,57	95,7 %	9,83	98,3 %
1	10	7,11	71,1 %	2,28	22,8 %
2,5	0	9,60	96,0 %	9,60	96,0 %
2,5	10	9,68	96,8 %	9,89	98,9 %
5	0	9,73	97,3 %	9,81	98,1 %
5	10	9,57	95,7 %	10,0	100 %
7,5	0	9,65	96,5 %	9,86	98,6 %
7,5	5	9,98	99,8 %	9,99	99,9 %
7,5	10	10,5	~ 100 %	10,2	~ 100 %
15	0	9,75	97,5 %	9,87	98,7 %
15	5	10,1	~ 100 %	10,1	~ 100 %
15	10	10,3	~ 100 %	10,7	~ 100 %

En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de sacarosa añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

10

Tabla

15

aditivo (sacarosa) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
0	0	9,64	96,4 %	9,74	97,4 %
0	5	10,0	100 %	10,0	100 %
0	10	1,63	16,3 %	0,66	6,6 %
7,5	0	9,56	95,6 %	9,76	97,6 %
7,5	5	10,2	~ 100 %	10,3	~ 100 %
7,5	10	4,49	44,9 %	1,58	15,8 %
15	0	9,82	98,2 %	9,90	99,0 %
15	5	10,4	~ 100 %	10,4	~ 100 %
15	10	7,80	78,0 %	3,33	33,3 %
20	0	9,71	97,1 %	9,80	98,0 %
20	10	9,96	99,6 %	10,2	~ 100 %
25	0	9,65	96,5 %	10,0	100 %
25	10	9,73	97,3 %	9,95	99,5 %

En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de fructosa añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

20

Tabla

aditivo (fructosa) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
0	0	9,79	97,9 %	9,56	95,6 %
0	5	9,93	99,3 %	9,85	98,5 %
0	10	0,98	9,8 %	0,42	4,2 %
7,5	0	9,76	97,6 %	9,78	97,8 %
7,5	5	9,97	99,7 %	10,1	> 100 %
7,5	10	3,85	38,5 %	1,42	14,2 %
15	0	10,0	100 %	9,49	94,9 %
15	5	10,1	> 100 %	10,0	100 %
15	10	8,23	82,3 %	3,76	37,6 %
20	0	9,65	96,5 %	9,91	99,1 %
20	10	9,92	99,2 %	10,3	> 100 %
25	0	10,0	100 %	9,61	96,1 %
25	10	9,99	99,9 %	10,3	> 100 %

5 En la tabla siguiente se muestra la dependencia de la solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 (10 mg/ml) y un anticuerpo anti-CSF-1R (10 mg/ml) como polipéptidos ejemplares a temperatura ambiente sobre la concentración de glucosa añadida como un ejemplo de un aditivo (citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) con una MW de 3500 Da, pH 5,0).

Tabla

10

aditivo (glucosa) [% en peso]	PEG-3500 [% en peso]	c (UV280) anticuerpo anti-IL17 [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-IL17 [fracción de conc. inicial]	c (UV280) anticuerpo anti-CSF-1R [mg/ml]	conc. proteína anticuerpo anti-CSF-1R [fracción de conc. inicial]
7,5	0	9,84	98,4 %	97,8	97,8 %
7,5	10	5,35	53,5 %	2,39	23,9 %
15	0	9,98	99,8 %	9,92	99,2 %
15	10	9,63	96,3 %	5,84	58,4 %
20	0	10,1	~ 100 %	10,1	~ 100 %
20	10	10,0	100 %	8,08	80,8 %
25	0	10,5	~ 100 %	10,4	~ 100 %
25	10	10,4	~ 100 %	10,3	~ 100 %

15 Cuando se combina un polímero no iónico con un aditivo en un procedimiento del se informa en este documento, se puede lograr un valor de resolución mejorado. En la siguiente tabla se muestra el valor de resolución obtenido de una combinación de poli(etilenglicol) 3500 a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y un aditivo a la concentración indicada en una separación cromatográfica de un anticuerpo anti-IL17.

Tabla

valor de resolución	anticuerpo anti-IL17	anticuerpo anti-CSF-1R
PEG al 5 %, MW 3500 Da	0,75	0,66
D-sorbitol, 15 % en peso	0,85	0,86
glicina, 8 % en peso	0,85	0,80
L-prolina, 8 % en peso	0,83	0,97
betaína, 8 % en peso	0,86	0,86
sacarosa, 25 % en peso	0,73	0,84
D-fructosa, 25 % en peso	0,79	0,91
D-glucosa, 25 % en peso	0,81	0,97
xilitol, 20 % en peso	0,76	0,94
glicerol, 30 % en peso	0,77	0,90

20

Si se usa un 10 % en peso de poli(etilenglicol) sin un aditivo, el anticuerpo precipita. Por lo tanto, el valor de referencia en la tabla anterior se determinó en presencia de un 5 % en peso del polímero no iónico.

En la tabla siguiente se muestra el cambio en el contenido de proteína de la célula hospedadora y el contenido de ADN de la célula hospedadora de una muestra sometida a un procedimiento del que se informa en el presente documento. Debe señalarse que, para determinar el contenido de proteína de la célula hospedadora y el contenido de ADN de la célula hospedadora, se debe aumentar el tamaño de la fracción, lo que da como resultado un valor de resolución reducido. La elución se efectúa en todos los ejemplos presentados aumentando la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil.

Tabla

anticuerpo anti-IL17			
condiciones de elución	valor de resolución	reducción de PCH en [%]	reducción del ADN de la célula hospedadora en [%]
sin polímero no iónico, sin aditivo	0,44	85,5	61,8
5 % en peso de PEG-3500	0,70	94,5	aumento
10 % en peso de PEG-3500, 15 % en peso de D-sorbitol	0,78	98,4	aumento
anticuerpo anti-CSF-1R			
condiciones de elución	Valor de resolución	reducción de PCH en [%]	reducción del ADN de la célula hospedadora en [%]
sin polímero no iónico, sin aditivo	0,56	98,6	80,9
5 % en peso de PEG-3500	0,66	99,5	77,7
10 % en peso de PEG-3500, 15 % en peso de D-sorbitol	0,88	99,7	17,0

Como se puede ver en la tabla anterior en un procedimiento cromatográfico que comprende un polímero no iónico y un aditivo en la solución de recuperación, el contenido de PCH (proteína de la célula hospedadora) en la preparación de anticuerpo recuperado se puede reducir en comparación con los procedimientos realizados en ausencia de esta combinación.

Por lo tanto, en el presente documento se informa de un procedimiento para producir una preparación de anticuerpo con contenido reducido de proteína de célula hospedadora mediante el cual la preparación se obtiene de un sobrenadante de cultivo de células de mamífero, especialmente un sobrenadante de cultivo de células CHO, que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende un polímero no iónico y un aditivo a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido un anticuerpo, por la que el anticuerpo en forma monomérica permanece adsorbido sobre un material de cromatografía de intercambio iónico, y
- recuperar el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo la preparación de anticuerpo con contenido reducido de proteína de célula hospedadora.

En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo y recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo,
- b) purificar el anticuerpo con un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende un polímero no iónico y un aditivo a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido un anticuerpo, por la que el anticuerpo en forma monomérica permanece adsorbido sobre un material de cromatografía de intercambio iónico, y
- 5
- recuperar el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo el anticuerpo.

10 En la siguiente tabla se muestran los valores de resolución obtenidos con diferentes materiales de cromatografía de intercambio catiónico con un anticuerpo anti-IL17. La elución se efectúa en todos los ejemplos presentados aumentando la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil.

Tabla

condiciones de elución	material de cromatografía	valor de resolución
sin polímero no iónico, sin aditivo	SP Sepharose FF	0,29
sin polímero no iónico, sin aditivo	Toyopearl CM-650M	0,53
sin polímero no iónico, sin aditivo	CM Sepharose FF	0,29
5 % en peso de PEG-3500	SP Sepharose FF	0,45
5 % en peso de PEG-3500	Toyopearl CM-650M	0,67
5 % en peso de PEG-3500	CM Sepharose FF	0,44
10 % en peso de PEG-3500 15 % en peso de D-sorbitol	SP Sepharose FF	0,51
10 % en peso de PEG-3500 15 % en peso de D-sorbitol	Toyopearl CM-650M	0,76
10 % en peso de PEG-3500 15 % en peso de D-sorbitol	CM Sepharose FF	0,51

15 En la siguiente tabla se muestran los valores de resolución obtenidos con un procedimiento del que se informa en el presente documento usando poli(etilenglicol) de MW 400 Da y de MW 10 000 Da como polímero no iónico con diferentes masas moleculares y el poliol sorbitol como aditivo con un anticuerpo anti-IL17.

20 **Tabla**

condiciones de elución	valor de resolución
10 % en peso de PEG-400; 15 % en peso de D-sorbitol	0,52
10 % en peso de PEG-400; 15 % D-sorbitol	0,56
10 % en peso de PEG-400; 15 % D-sorbitol	0,57
promedio:	0,55
10 % en peso de PEG-10 000; 15 % D-sorbitol	0,58
10 % en peso de PEG-10 000; 15 % D-sorbitol	0,70
10 % en peso de PEG-10 000; 15 % D-sorbitol	0,65
promedio:	0,64

25 Dependiendo de la pureza prevista después de realizar un procedimiento del que se informa en el presente documento, la recuperación del polipéptido monomérico varía dependiendo de la combinación de la concentración del polímero no iónico y el aditivo.

A continuación, esta interrelación se ejemplifica con poli(etilenglicol) como polímero no iónico, sorbitol como aditivo y un anticuerpo anti-IL17 como polipéptido.

30 En la tabla siguiente se muestra la recuperación y la pureza final del anticuerpo anti-IL17 monomérico con una pureza de al menos un 99 % en las fracciones de elución combinadas dependiendo de la concentración de poli(etilenglicol) y sorbitol.

Tabla

recuperación de monómero [%]	sorbitol [% en peso] →								
	0	3	5	10	15	20	30	40	
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	82,3			77,9				
	5	87,0			84,5				
	6	89,0							
	8	82,7							
	9	86,1	92,6						
	10	86,1		88,5	89,2	88,6	90,0	84,9	88,1
	15						87,1		
pureza de monómero [%]	sorbitol [% en peso] →								
	0	3	5	10	15	20	30	40	
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	99,5			99,5				
	5	99,3			99,3				
	6	99,3							
	8	98,9							
	9	99,0	99,1						
	10	99,1		98,8	98,9	99,3	99,2	99,1	99,0
	15						99,2		

Los valores para las celdas vacías no se determinaron.

5

En la tabla siguiente se muestra la recuperación y la pureza final del anticuerpo anti-IL17 monomérico con una pureza de al menos un 99,5 % en las fracciones de elución combinadas dependiendo de la concentración de poli(etilenglicol) y sorbitol.

10

Tabla

recuperación de monómero [%]	sorbitol [% en peso] →								
	0	3	5	10	15	20	30	40	
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	82,3			77,9				
	5	81,3			78,7				
	6	83,3							
	8	81,1							
	9	84,3	92,0						
	10	84,9		85,3	88,2	87,1	87,0	81,5	82,8
	15						86,0		
pureza de monómero [%]	sorbitol [% en peso] →								
	0	3	5	10	15	20	30	40	
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	99,5			99,5				
	5	99,8			99,9				
	6	99,8							
	8	99,8							
	9	99,5	99,5						
	10	99,5		100,0	99,5	99,7	99,7	99,8	99,6
	15						99,5		

Los valores para las celdas vacías no se determinaron.

En la tabla siguiente se muestra la recuperación y la pureza final del anticuerpo anti-IL17 monomérico con una pureza de al menos un 99,9 % en las fracciones de elución combinadas dependiendo de la concentración de poli(etilenglicol) y sorbitol.

5

Tabla

recuperación de monómero [%]	sorbitol [% en peso]								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	66,3				63,9			
	5	67,9				78,7			
	6	66,0							
	8	75,1							
	9	76,9	89,1						
	10	80,4		85,3	83,1	84,5	81,3	76,0	64,6
	15						80,9		
pureza de monómero [%]	sorbitol [% en peso]								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	99,9				100,0			
	5	100,0				99,9			
	6	100,0							
	8	100,0							
	9	99,9	99,9						
	10	99,9		100,0	100,0	99,9	99,9	100,0	100,0
	15						99,9		

Los valores para las celdas vacías no se determinaron.

10 En la tabla siguiente se muestra la recuperación y la pureza final del anticuerpo anti-IL17 monomérico con una pureza de un 100 % en las fracciones de elución combinadas dependiendo de la concentración de poli(etilenglicol) y sorbitol.

15

Tabla

recuperación de monómero [%]	sorbitol [% en peso]								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	41,1				63,9			
	5	67,9				67,1			
	6	66,0							
	8	75,1							
	9	67,0	84,7						
	10	75,8		85,3	83,1	68,7	70,5	76,0	64,6
	15						75,5		
pureza de monómero [%]	sorbitol [% en peso]								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG-3500 [% en peso] ↓	0	100,0				100,0			
	5	100,0				100,0			
	6	100,0							
	8	100,0							
	9	100,0	100,0						
	10	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	15						100,0		

Los valores para las celdas vacías no se determinaron.

En general, una etapa de separación cromatográfica comprende varias subetapas:

- 5
- equilibrar el material cromatográfico empaquetado en una columna de cromatografía,
 - aplicar la solución que comprende el polipéptido de interés al material de cromatografía equilibrado en condiciones adecuadas para la adsorción/unión del polipéptido de interés sobre el material de cromatografía y cargar de este modo la columna de cromatografía,
 - 10 - lavar opcionalmente el material cromatográfico sin desorber/eluir el polipéptido de interés del material cromatográfico,
 - 15 - recuperar el polipéptido de interés aplicando una solución de recuperación al material cromatográfico y, por lo tanto, desorbiendo/eluyendo el polipéptido de interés del material cromatográfico.

20 En un modo de realización, el material de cromatografía de intercambio catiónico en la columna se equilibra antes de la aplicación de la solución que comprende el polipéptido a la columna. Esto se puede lograr aplicando un tampón de equilibrado a la columna para establecer un valor del pH y/o conductividad y/o concentración de sal adecuados dentro o sobre el material de cromatografía de intercambio catiónico.

25 En un modo de realización, la solución que comprende el polipéptido se ajusta a condiciones similares a aquellas en las que se equilibra la columna de cromatografía de intercambio catiónico.

30 Son posibles diferentes procedimientos para cargar la columna de cromatografía con el polipéptido de interés. En un modo de realización, el polipéptido de interés se añade a la solución y se carga en la columna. En otro modo de realización, el polipéptido de interés se añade después de equilibrar y/o lavar la columna. En un modo de realización, el equilibrado comprende la aplicación de un tampón de unión antes de cargar la solución sobre el material cromatográfico.

Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento del que se informa en el presente documento se realiza en modo de unión y elución.

35 La recuperación del polipéptido en forma monomérica en el procedimiento del que se informa en el presente documento se puede llevar a cabo usando un gradiente lineal, un gradiente escalonado, o una combinación de un gradiente lineal y escalonado. Un gradiente lineal se puede usar, por ejemplo, para mejorar aún más la resolución del polipéptido en forma monomérica con respecto al polipéptido en forma agregada y/o con respecto a otros contaminantes tales como la proteína de la célula hospedadora. Se puede usar un gradiente escalonado para reducir el volumen de la solución polipeptídica recuperada. La selección y el uso de cualquier gradiente en la recuperación del polipéptido del material de cromatografía de intercambio catiónico puede hacerla fácilmente un experto en la técnica.

45 En un modo de realización, la aplicación de la solución que comprende el polipéptido va seguida por la aplicación de una solución de lavado tamponada al material de cromatografía, a menudo de la misma composición que el tampón de equilibrado.

50 En un modo de realización, la concentración del polímero no iónico se mantiene constante durante la elución, mientras se cambia el valor del pH y/o se aumenta la concentración de la sal que provoca la elución.

En un modo de realización, la concentración del polímero no iónico se incrementa durante la elución, mientras se cambia el valor de pH y/o se aumenta la concentración de una sal que provoca la elución.

55 En un modo de realización, la concentración del polímero no iónico se reduce durante la elución, mientras que el valor del pH y/o la concentración de la sal se mantienen constantes.

Después de su uso, el material de cromatografía de intercambio catiónico se puede limpiar, desinfectar y almacenar en un agente apropiado.

60 El procedimiento del que se informa en el presente documento se puede practicar en combinación con una o más de otras etapas o procedimientos cromatográficos, tales como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad con proteína A y otras formas de cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba u otra cromatografía en modo mixto.

65 El procedimiento como del que se informa en el presente documento se puede practicar en una columna de lecho empaquetado, una columna de lecho fluidizado/expandido que contiene el material de cromatografía de

intercambio catiónico y/o una operación por lotes en la que el material de cromatografía de intercambio catiónico se mezcla con la preparación de polipéptido durante un cierto tiempo.

El procedimiento del que se informa en el presente documento es útil para producir polipéptidos biológicamente activos en forma monomérica. Dichos polipéptidos biológicamente activos se pueden seleccionar entre anticuerpos, variantes de anticuerpos, conjugados de anticuerpos. En otro modo de realización, el polipéptido de interés es un anticuerpo, especialmente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser de cualquier mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, oveja, vaca o un animal transgénico con un locus de inmunoglobulina humana, o puede ser una variante deficitaria en epítipo de linfocitos T rechapada humanizada del mismo.

Se debe entender que un experto en la técnica puede practicar el procedimiento del que se informa en el presente documento para producir cualquier polipéptido. Por lo tanto, un anticuerpo como se usa en el presente documento se debe tratar como un ejemplo de un polipéptido.

En el procedimiento del que se informa en el presente documento se puede usar una preparación de anticuerpo diferente, tal como anticuerpos no purificados (en bruto) o parcialmente purificados de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes. Las preparaciones de anticuerpos en bruto se pueden obtener de diversas fuentes, incluyendo, pero sin limitación, plasma, suero, ascitis o leche de un animal experimental, extractos de plantas, lisados de células bacterianas, lisados de levaduras o medios de cultivo de células animales acondicionados. Se pueden obtener preparaciones parcialmente purificadas a partir de preparaciones en bruto que se han sometido a al menos una cromatografía, precipitación, otra etapa de fraccionamiento o cualquier combinación de las mismas. La etapa de precipitación puede incluir cualquier procedimiento, tal como precipitación con sal o poli(etilenglicol). También se pueden usar otras etapas de fraccionamiento tales como cristalización o filtración por membrana. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo no pegilado.

Con el procedimiento del que se informa en el presente documento se puede obtener un polipéptido que está sustancialmente libre de agregados. En un modo de realización, el contenido del polipéptido en forma agregada como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño es inferior a aproximadamente un 5 % basado en el área total del pico. En otro modo de realización, el contenido del polipéptido en forma agregada es menor de aproximadamente un 1 %. En un modo de realización adicional, la cantidad del polipéptido en forma agregada es menor de aproximadamente un 0,5 %. En otro modo de realización más, la cantidad del polipéptido en forma agregada es menor de aproximadamente un 0,1 %.

Recientemente se ha publicado un nuevo formato de anticuerpo bivalente biespecífico (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (2011) 11187-11192), el llamado «CrossMab». Este anticuerpo biespecífico comprende cuatro cadenas de anticuerpo diferentes, es decir, dos cadenas ligeras diferentes y dos cadenas pesadas diferentes. Durante la expresión se pueden formar diferentes impurezas relacionadas con el producto. Una de estas impurezas relacionadas con el producto es el llamado «anticuerpo ¾», un anticuerpo al que le falta una cadena ligera, que presenta una masa molecular de aproximadamente 125 kDa en comparación con una masa de aproximadamente 150 kDa para un anticuerpo de cuatro cadenas completo. Estos tipos de fragmentos de anticuerpos se pueden formar en general durante la expresión de anticuerpos.

Por lo tanto, en el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo de cuatro cadenas de longitud completa que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo y recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo,

b) purificar el anticuerpo con un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico que comprende las siguientes etapas:

- aplicar una solución que comprende un polímero no iónico y un aditivo a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido un anticuerpo, por la que el anticuerpo de longitud completa de cuatro cadenas en forma monomérica permanece adsorbido sobre un material de cromatografía de intercambio iónico, y

- recuperar el anticuerpo de longitud completa de cuatro cadenas en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución, y produciendo de este modo el anticuerpo.

El material de cromatografía de intercambio iónico es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

El polímero no iónico se puede seleccionar del grupo que comprende poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros PEG-PPG y copolímeros tribloque compuestos de poli(oxipropileno) (poli(óxido de

propileno)) flanqueado por poli(oxietileno) (poli(óxido de etileno)). En un modo de realización, el polímero no iónico es poli(etilenglicol).

5 El aditivo se puede seleccionar del grupo que comprende zwitteriones, aminoácidos, urea, derivados de urea, anfolitos, CHAPSO, productos naturales, azúcares y polioles. En un modo de realización adicional, el aditivo es sorbitol.

10 El polímero no iónico puede tener una concentración de aproximadamente un 5 % a un 15 % en peso y/o el aditivo puede tener una concentración de un 3 % a un 25 % en peso.

En un modo de realización de todos los aspectos como se han descrito anteriormente, el polipéptido es un anticuerpo de clase IgG. En otro modo de realización, el polipéptido es un anticuerpo de clase IgG, subclase IgG1o subclase IgG2 o subclase IgG3 o subclase IgG4.

15 En un modo de realización de todos los aspectos como se han descrito anteriormente, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

20 - aplicar una primera solución que comprende opcionalmente un polímero no iónico y un aditivo a un material cromatográfico de intercambio iónico y equilibrar de este modo el material de cromatografía de intercambio iónico,

25 - aplicar una solución tamponada que comprende el polipéptido al material de cromatografía equilibrado y adsorber de ese modo el polipéptido sobre el material de cromatografía, por la que la solución está esencialmente libre de un polímero no iónico y un aditivo,

- aplicar una solución tamponada que comprende un polímero no iónico y un aditivo al material de cromatografía, por la que el polipéptido en forma monomérica permanece adsorbido sobre el material de cromatografía de intercambio iónico, y

30 - recuperar el polipéptido en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende un polímero no iónico, un aditivo y un compuesto de elución.

En un modo de realización, la recuperación es por gradiente de elución.

35 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Figuras:

Figura 1 Cromatograma de elución de la cromatografía de intercambio catiónico del anticuerpo anti-IL17 en el material de cromatografía de intercambio catiónico.

Figura 2 Distribución de anticuerpo en forma monomérica y anticuerpo en forma agregada en las fracciones recogidas.

Figura 3 Solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 y un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende poli(etilenglicol) 4000 a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes polioles en concentraciones variables como aditivo.

Figura 4 Solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 y un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende poli(etilenglicol) 4000 a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes aminoácidos en concentraciones variables como aditivo.

Figura 5 Solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 y un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende poli(etilenglicol) a una concentración de un 10 % en peso como un ejemplo de un polímero no iónico y diferentes azúcares en concentraciones variables como aditivo.

Figura 6 Distribución de anticuerpo en forma monomérica, fragmento anticuerpo ¾ y anticuerpo en forma agregada en las fracciones recogidas para los ejemplos 25 y 26.

40 **Material:**

45 Cada anticuerpo (anticuerpo anti-IL17: para las secuencias véase el documento WO 2010/034443, anticuerpo anti-CSF-1R: para las secuencias véase el documento PCT/EP2010/069090; anticuerpo anti-Ang2/VEGF: para las secuencias véase el documento WO 2010/040508) se purificó en una primera etapa con una cromatografía de afinidad con proteína A. La elución de la columna con proteína A se llevó a cabo en condiciones ácidas.

Después, el pH de la muestra se ajustó a aproximadamente pH 3,5 con ácido cítrico 1 M y se incubó durante ~1 hora. Posteriormente, el pH se ajustó a 5,0 o 5,5 añadiendo TRIS/HCl 1 M, pH 8-9 o solución TRIS 1 M (TRIS: tris-hidroximetil-amino-metano). Después de la incubación a 4 °C durante 12-18 horas, la muestra se filtró en profundidad. La muestra es una solución con una concentración de proteína de entre 5 mg/ml y 20 mg/ml. Este material se denomina a continuación eluido de proteína A acondicionado, que está preparado para cargarse en un material de cromatografía de intercambio catiónico.

El anticuerpo anti-Ang2/VEGF se purificó además mediante cromatografía de intercambio aniónico: El valor del pH del eluido de proteína A acondicionado se ajustó a 7,5 mediante la adición de solución tampón TRIS 1 M. Posteriormente, la muestra se procesó mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH 7,5 en modo de fracción no adsorbida.

En el primer ejemplo se ha llevado a cabo el procedimiento del que se informa en el presente documento. Por lo tanto, en el Ejemplo 1 se dan todas las condiciones del procedimiento. En los ejemplos siguientes, solo se enumeran las diferencias. Todos los parámetros no mencionados son idénticos.

Ejemplo 1

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Material de intercambio: Poros 50HS

Columna: 8 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud, 5,03 ml de volumen

Caudal: 90 cm/h (= 0,75 ml/min)

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado 1: tampón citrato de sodio 10 mM, ajustado a pH 5,0, 1 volumen de columna

Solución de lavado 2: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El eluido de proteína A acondicionado se aplicó a una columna de cromatografía que contenía el material de cromatografía de intercambio iónico. Después de la etapa de carga a un caudal de 90 cm/h, la columna se lavó con la solución de lavado 1 (1 volumen de columna) y la solución de lavado 2 (3 volúmenes de columna). El anticuerpo en forma monomérica se recuperó con un procedimiento de elución de gradiente lineal, por lo que el valor de pH se mantuvo constante y la conductividad se varió (aumentó) mediante la adición de cloruro de sodio.

En la Figura 1 se muestra el cromatograma de elución de la cromatografía de intercambio catiónico del anticuerpo anti-IL17 en el material de cromatografía de intercambio catiónico. El anticuerpo en forma monomérica y el anticuerpo en forma agregada se separan.

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	8,93	10,7	95,67	93,35	6,65

fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0
fracción 1	0,45	3,0	1,35	100	0
fracción 2	2,92	3,0	8,76	100	0
fracción 3	6,30	3,0	18,90	100	0
fracción 4	8,45	3,0	25,35	100	0
fracción 5	6,50	3,0	19,50	99,61	0,39
fracción 6	2,21	3,0	6,63	89,70	10,30
fracción 7	1,28	3,0	3,84	53,47	46,53
fracción 8	1,41	3,0	4,23	36,58	63,42
fracción 9	0,97	3,0	2,91	30,93	69,07
fracción 10	0,45	3,0	1,35	18,96	81,04
fracción 11	0,20	3,0	0,60	20,38	79,62
muestra	cantidad de PCH CHO basada en la cantidad de anticuerpo [ng/mg]	cantidad de PCH CHO [ng]	cantidad de ADN de CH CHO basada en la cantidad de anticuerpo [pg/mg]	cantidad de ADN de CH CHO [pg]	
eluido de proteína A acondicionado	471	45.061	0,80	76,54	
fracción no adsorbida	< 5 ng/ml	< 15	< 0,4 pg/ml	< 1,2	
fracción 1	< 18	< 24	< 9	< 12,15	
fracción 2	< 2,74	< 24	< 1	< 8,76	
fracción 3	< 1,27	< 24	< 0,63	< 11,91	
fracción 4	0,991	25	< 0,96	< 24,34	
fracción 5	1,394	27	1	19,50	
fracción 6	7,923	53	6	39,78	
fracción 7	19	73	10	38,40	
fracción 8	14	59	10	42,30	
fracción 9	30	87	15	43,65	
fracción 10	91	123	26	35,10	
fracción 11	316	190	53	31,80	

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,78.

5 **Ejemplo 2**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	12,9	7,71	99,48	99,19	0,81
fracción no adsorbida	0,00	~ 60	0,00	-	-
fracción 1	0,99	3,00	2,97	100	0
fracción 2	5,84	3,00	17,52	100	0
fracción 3	8,30	3,00	24,90	100	0
fracción 4	7,87	3,00	23,61	100	0

fracción 5	5,67	3,00	17,01	100	0
fracción 6	1,94	3,00	5,82	100	0
fracción 7	0,58	3,00	1,74	94,21	5,79
fracción 8	0,41	3,00	1,23	87,79	12,21
fracción 9	0,23	1,50	0,35	84,58	15,42
muestra	cantidad de PCH CHO basada en la cantidad de anticuerpo [ng/mg]	cantidad de PCH CHO [ng]	cantidad de ADN de CH CHO basada en la cantidad de anticuerpo [pg/mg]	cantidad de ADN de CH CHO [pg]	
eluido de proteína A acondicionado	1.260	125.345	2	198,96	
fracción no adsorbida	< 5 ng/ml	< 15	< 0,4 pg/ml	< 1,2	
fracción 1	< 8,081	< 24	< 4	11,88	
fracción 2	1,579	28	< 0,68	70,08	
fracción 3	< 0,602	< 15	< 0,48	16,93	
fracción 4	< 1,017	< 24	1	11,33	
fracción 5	2,797	48	1	17,01	
fracción 6	14	81	5	5,82	
fracción 7	50	87	19	8,70	
fracción 8	99	122	28	23,37	
fracción 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,88.

Ejemplo 3

5

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón acetato de sodio 35 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón acetato de sodio 35 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 1 volumen de columna

Solución de elución: tampón acetato de sodio 35 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	11,0	102,98	92,76	7,24
fracción no adsorbida	0,00	~ 50	0,00	0	0

fracción 1	0,43	2,0	0,86	100	0
fracción 2	2,77	2,0	5,54	100	0
fracción 3	6,10	2,0	12,20	100	0
fracción 4	8,02	2,0	16,04	100	0
fracción 5	8,56	2,0	17,12	100	0
fracción 6	7,86	2,0	15,72	100	0
fracción 7	5,59	2,0	11,18	99,77	0,23
fracción 8	2,74	2,0	5,48	97,75	2,25
fracción 9	1,34	2,0	2,68	85,98	14,02
fracción 10	1,13	2,0	2,26	55,26	44,74
fracción 11	1,31	2,0	2,62	35,5	64,5
fracción 12	1,41	2,0	2,82	24,86	75,14
fracción 13	1,18	2,0	2,36	22,22	77,78
fracción 14	0,79	2,0	1,58	15,47	84,53
fracción 15	0,48	2,0	0,96	13,63	86,37
fracción 16	0,29	2,0	0,58	13,73	86,27
fracción 17	0,18	2,0	0,36	16,03	83,97

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,86.

5 **Ejemplo 4**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón MES 25 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,5, 4 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón MES 35 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,5, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón MES 35 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,5

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,99	102,87	92,85	7,15
fracción no adsorbida	0,00	~ 50	0,00	0	0
fracción 1	0,28	2,0	0,56	100	0
fracción 2	1,45	2,0	2,90	100	0
fracción 3	4,43	2,0	8,86	100	0
fracción 4	7,17	2,0	14,34	100	0
fracción 5	8,90	2,0	17,80	100	0
fracción 6	8,85	2,0	17,70	100	0

ES 2 656 167 T3

fracción 7	6,64	2,0	13,28	99,65	0,35
fracción 8	2,97	2,0	5,94	93,13	6,87
fracción 9	1,61	2,0	3,22	67,63	32,37
fracción 10	1,50	2,0	3,00	34,08	65,92
fracción 11	1,51	2,0	3,02	25,22	74,78
fracción 12	1,19	2,0	2,38	22,68	77,32
fracción 13	0,72	2,0	1,44	20,45	79,55
fracción 14	0,43	2,0	0,86	17,36	82,64
fracción 15	0,25	2,0	0,50	16,24	83,76
fracción 16	0,15	2,0	0,30	18,61	81,39

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,77.

5 **Ejemplo 5**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Material de intercambio: SP Sepharose FF

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado 1: tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 1 volumen de columna

Solución de lavado 2: tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0

Solución de elución: tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,7	100,07	92,90	7,10
fracción no adsorbida	0,00	~ 50	0,00	-	-
fracción 1	0,18	2,00	0,36	100	0
fracción 2	0,74	2,00	1,48	100	0
fracción 3	1,97	2,00	3,94	100	0
fracción 4	3,62	2,00	7,24	100	0
fracción 5	5,15	2,00	10,30	100	0
fracción 6	6,17	2,00	12,34	99,65	0,35
fracción 7	6,25	2,00	12,50	99,23	0,77
fracción 8	5,64	2,00	11,28	98,11	1,89
fracción 9	4,53	2,00	9,06	96,18	3,82
fracción 10	3,34	2,00	6,68	92,74	7,26
fracción 11	2,37	2,00	4,74	85,49	14,51

fracción 12	1,63	2,00	3,26	77,02	22,98
fracción 13	1,15	2,00	2,30	63,27	36,73
fracción 14	0,83	2,00	1,66	48,97	51,03
fracción 15	0,60	2,00	1,20	36,01	63,99
fracción 16	0,44	2,00	0,88	25,04	74,96
fracción 17	0,32	2,00	0,64	19,77	80,23
fracción 18	0,23	2,00	0,46	17,00	83,00
fracción 19	0,16	2,00	0,32	16,62	83,38

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,51.

5 Ejemplo 6

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido:	anticuerpo anti-IL17
Material de intercambio:	Toyopearl CM-650 M
Solución de equilibrado:	tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna
Carga:	20 g de proteína/l material de cromatografía
Solución de lavado 1:	tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 1 volumen de columna
Solución de lavado 2:	tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0
Solución de elución:	tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0
Procedimiento de elución:	gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,38	10,7	100,32	93,05	6,95
fracción no adsorbida	0,00	~ 50	0,00	0	0
fracción 1	0,58	2,00	1,16	100	0
fracción 2	1,63	2,00	3,26	100	0
fracción 3	2,89	2,00	5,78	100	0
fracción 4	4,13	2,00	8,26	100	0
fracción 5	5,01	2,00	10,02	100	0
fracción 6	5,49	2,00	10,98	100	0
fracción 7	5,58	2,00	11,16	100	0
fracción 8	5,24	2,00	10,48	100	0
fracción 9	4,52	2,00	9,04	100	0
fracción 10	3,48	2,00	6,96	99,29	0,71

fracción 11	2,41	2,00	4,82	97,27	2,73
fracción 12	1,58	2,00	3,16	91,13	8,87
fracción 13	1,15	2,00	2,30	75,73	24,27
fracción 14	0,99	2,00	1,98	44,16	55,84
fracción 15	0,94	2,00	1,88	17,21	82,79
fracción 16	0,88	2,00	1,76	16,96	83,04
fracción 17	0,75	2,00	1,50	10,07	89,93
fracción 18	0,58	2,00	1,16	8,64	91,36
fracción 19	0,43	2,00	0,86	0,85	99,15
fracción 20	0,31	2,00	0,62	0	100
fracción 21	0,21	2,00	0,42	0	100
fracción 22	0,15	2,00	0,30	0	100

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,76.

5 Ejemplo 7

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Material de intercambio: CM Sepharose FF

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado 1: tampón citrato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5,0, 1 volumen de columna

Solución de lavado 2: tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0

Solución de elución: tampón citrato de sodio 30 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,55	10,7	102,02	93,04	6,96
fracción no adsorbida	0,00	~ 50	0,00	-	-
fracción 1	0,14	2,00	0,28	98,77	1,23
fracción 2	0,47	2,00	0,94	100	0
fracción 3	1,16	2,00	2,32	100	0
fracción 4	2,19	2,00	4,38	100	0
fracción 5	3,32	2,00	6,64	100	0
fracción 6	4,38	2,00	8,76	100	0
fracción 7	4,98	2,00	9,96	99,79	0,21
fracción 8	5,37	2,00	10,74	99,48	0,52
fracción 9	5,18	2,00	10,36	98,65	1,35

fracción 10	4,61	2,00	9,22	98,21	1,79
fracción 11	3,89	2,00	7,78	96,20	3,80
fracción 12	3,01	2,00	6,02	93,77	6,23
fracción 13	2,35	2,00	4,70	89,37	10,63
fracción 14	1,76	2,00	3,52	83,97	16,03
fracción 15	1,30	2,00	2,60	75,39	24,61
fracción 16	0,98	2,00	1,96	63,61	36,39
fracción 17	0,74	2,00	1,48	51,68	48,32
fracción 18	0,57	2,00	1,14	37,62	62,38
fracción 19	0,44	2,00	0,88	30,42	69,58
fracción 20	0,33	2,00	0,66	22,95	77,05
fracción 21	0,23	2,00	0,46	21,01	78,99
fracción 22	0,19	2,00	0,38	16,76	83,24
fracción 23	0,15	2,00	0,30	15,29	84,71

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,51.

5 **Ejemplo 8**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,77	100,24	94,23	5,77	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	-	-	0
fracción 1	0,62	1,5	0,93	82,66	0	17,34
fracción 2	2,85	1,5	4,28	100	0	0
fracción 3	5,59	1,5	8,39	100	0	0
fracción 4	7,15	1,5	10,73	100	0	0
fracción 5	7,89	1,5	11,84	100	0	0
fracción 6	7,81	1,5	11,72	100	0	0
fracción 7	7,31	1,5	10,97	100	0	0
fracción 8	6,21	1,5	9,32	100	0	0

ES 2 656 167 T3

fracción 9	4,48	1,5	6,72	99,78	0,22	0
fracción 10	2,74	1,5	4,11	98,36	1,64	0
fracción 11	1,65	1,5	2,48	94,44	5,56	0
fracción 12	1,24	1,5	1,86	77,49	22,51	0
fracción 13	1,23	1,5	1,85	57,48	42,52	0
fracción 14	1,39	1,5	2,09	43,27	56,73	0
fracción 15	1,43	1,5	2,15	36,42	63,58	0
fracción 16	1,30	1,5	1,95	34,12	65,88	0
fracción 17	1,01	1,5	1,52	29,98	70,02	0
fracción 18	0,72	1,5	1,08	23,98	76,02	0
fracción 19	0,48	1,5	0,72	26,01	73,99	0
fracción 20	0,32	1,5	0,48	20,98	79,02	0
fracción 21	0,22	1,5	0,33	20,23	79,77	0
fracción 22	0,15	1,5	0,23	21,64	78,36	0

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,76.

5 **Ejemplo 9**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), xilitol al 20 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,3	7,41	98,58	99,19	0,81	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	0	0	0
fracción 1	1,74	1,5	2,61	100	0	0
fracción 2	4,90	1,5	7,35	100	0	0
fracción 3	6,98	1,5	10,47	100	0	0
fracción 4	7,83	1,5	11,75	100	0	0
fracción 5	7,96	1,5	11,94	100	0	0
fracción 6	7,69	1,5	11,54	100	0	0
fracción 7	7,20	1,5	10,80	100	0	0
fracción 8	6,37	1,5	9,56	100	0	0

ES 2 656 167 T3

fracción 9	4,73	1,5	7,10	100	0	0
fracción 10	3,14	1,5	4,71	100	0	0
fracción 11	1,78	1,5	2,67	99,57	0,43	0
fracción 12	0,89	1,5	1,34	98,06	1,94	0
fracción 13	0,64	1,5	0,96	91,40	8,60	0
fracción 14	0,57	1,5	0,86	70,19	21,01	8,80
fracción 15	0,55	1,5	0,83	63,04	28,85	8,11
fracción 16	0,43	1,5	0,65	58,67	31,48	9,85
fracción 17	0,28	1,5	0,42	57,19	34,17	8,64

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,93.

5 **Ejemplo 10**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

10 El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,69	100,04	93,93	6,07	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	0	0	0
fracción 1	0,92	1,5	1,38	66,77	0	33,23
fracción 2	2,90	1,5	4,35	100	0	0
fracción 3	5,06	1,5	7,59	100	0	0
fracción 4	6,36	1,5	9,54	100	0	0
fracción 5	6,71	1,5	10,07	100	0	0
fracción 6	6,74	1,5	10,11	100	0	0
fracción 7	6,45	1,5	9,68	100	0	0
fracción 8	5,71	1,5	8,57	100	0	0
fracción 9	4,70	1,5	7,05	99,84	0,16	0
fracción 10	3,50	1,5	5,25	99,54	0,46	0
fracción 11	2,40	1,5	3,60	98,34	1,66	0
fracción 12	1,61	1,5	2,42	94,80	5,20	0
fracción 13	1,23	1,5	1,85	86,37	13,63	0

ES 2 656 167 T3

fracción 14	1,16	1,5	1,74	66,30	33,70	0
fracción 15	1,28	1,5	1,92	48,88	51,12	0
fracción 16	1,38	1,5	2,07	30,96	69,04	0
fracción 17	1,34	1,5	2,01	29,30	70,70	0
fracción 18	0,88	1,5	1,32	30,99	69,01	0
fracción 19	0,89	1,5	1,34	27,69	72,33	0
fracción 20	0,64	1,5	0,96	31,36	68,64	0
fracción 21	0,56	1,5	0,84	30,76	69,24	0
fracción 22	0,35	1,5	0,53	29,23	70,77	0
fracción 23	0,25	1,5	0,38	27,83	72,17	0
fracción 24	0,18	1,5	0,27	27,50	72,50	0

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,77.

5 Ejemplo 11

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicerol al 30 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,3	7,55	100,64	99,13	0,87	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	0	0	0
fracción 1	1,27	1,5	1,91	81,59	0	18,41
fracción 2	3,61	1,5	5,42	100	0	0
fracción 3	5,45	1,5	8,18	100	0	0
fracción 4	6,36	1,5	9,54	100	0	0
fracción 5	6,48	1,5	9,72	100	0	0
fracción 6	6,50	1,5	9,75	100	0	0
fracción 7	6,28	1,5	9,42	100	0	0
fracción 8	5,79	1,5	8,69	100	0	0
fracción 9	5,17	1,5	7,76	100	0	0
fracción 10	4,25	1,5	6,38	100	0	0
fracción 11	3,26	1,5	4,89	100	0	0

ES 2 656 167 T3

fracción 12	2,27	1,5	3,41	99,85	0,15	0
fracción 13	1,43	1,5	2,15	93,21	0,35	6,45
fracción 14	0,86	1,5	1,29	69,58	1,24	29,18
fracción 15	0,60	1,5	0,90	58,01	5,92	36,07
fracción 16	0,51	1,5	0,77	51,57	15,49	32,94
fracción 17	0,50	1,5	0,75	46,54	26,33	27,14
fracción 18	0,45	1,5	0,68	43,00	31,02	25,97
fracción 19	0,43	1,5	0,65	36,82	38,46	24,72
fracción 20	0,27	1,5	0,41	37,11	38,01	24,87

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,90.

5 **Ejemplo 12**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,71	96,91	94,97	5,03	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	1,12	1,5	1,68	93,40	0	6,60
fracción 2	3,57	1,5	5,36	100	0	0
fracción 3	6,05	1,5	9,08	100	0	0
fracción 4	7,44	1,5	11,16	100	0	0
fracción 5	7,8	1,5	11,70	100	0	0
fracción 6	7,64	1,5	11,46	100	0	0
fracción 7	6,96	1,5	10,44	100	0	0
fracción 8	5,89	1,5	8,84	100	0	0
fracción 9	4,35	1,5	6,53	99,82	0,18	0
fracción 10	2,85	1,5	4,28	98,95	1,05	0
fracción 11	1,81	1,5	2,72	95,18	4,82	0
fracción 12	1,33	1,5	2,00	85,83	14,17	0
fracción 13	1,23	1,5	1,85	70,44	29,56	0

ES 2 656 167 T3

fracción 14	1,26	1,5	1,89	59,07	40,93	0
fracción 15	1,2	1,5	1,80	50,95	49,05	0
fracción 16	1,01	1,5	1,52	43,67	56,33	0
fracción 17	0,77	1,5	1,16	42,33	57,67	0
fracción 18	0,53	1,5	0,80	36,74	63,26	0
fracción 19	0,36	1,5	0,54	37,68	62,32	0
fracción 20	0,25	1,5	0,38	36,00	64,00	0
fracción 21	0,18	1,5	0,27	34,41	65,59	0

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,73.

5 **Ejemplo 13**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), sacarosa al 25 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,8	7,55	100,44	99,23	0,77	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	1,78	1,5	2,67	100	0	0
fracción 2	4,54	1,5	6,81	100	0	0
fracción 3	6,45	1,5	9,68	100	0	0
fracción 4	7,46	1,5	11,19	100	0	0
fracción 5	7,50	1,5	11,25	100	0	0
fracción 6	7,35	1,5	11,03	100	0	0
fracción 7	6,79	1,5	10,19	100	0	0
fracción 8	6,01	1,5	9,02	100	0	0
fracción 9	4,87	1,5	7,31	100	0	0
fracción 10	3,63	1,5	5,45	100	0	0
fracción 11	2,38	1,5	3,57	100	0	0
fracción 12	1,41	1,5	2,12	99,73	0,27	0
fracción 13	0,84	1,5	1,26	98,71	1,29	0
fracción 14	0,60	1,5	0,90	83,46	5,09	11,45

ES 2 656 167 T3

fracción 15	0,52	1,5	0,78	74,12	9,89	15,99
fracción 16	0,44	1,5	0,66	71,45	11,73	16,82
fracción 17	0,33	1,5	0,50	70,55	13,67	15,77
fracción 18	0,22	1,5	0,33	61,41	14,38	24,21

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,84.

5 Ejemplo 14

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,7	100,18	95,11	4,89	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	0	0	0
fracción 1	0,93	1,5	1,40	79,49	0	20,51
fracción 2	3,94	1,5	5,91	100	0	0
fracción 3	6,68	1,5	10,02	100	0	0
fracción 4	7,86	1,5	11,79	100	0	0
fracción 5	7,98	1,5	11,97	100	0	0
fracción 6	7,52	1,5	11,28	100	0	0
fracción 7	6,83	1,5	10,25	100	0	0
fracción 8	5,75	1,5	8,63	100	0	0
fracción 9	4,45	1,5	6,68	99,78	0,22	0
fracción 10	3,08	1,5	4,62	99,45	0,55	0
fracción 11	1,97	1,5	2,96	97,64	2,36	0
fracción 12	1,39	1,5	2,09	92,02	7,98	0
fracción 13	1,06	1,5	1,59	78,43	21,57	0
fracción 14	1,13	1,5	1,70	59,36	40,64	0
fracción 15	1,24	1,5	1,86	44,05	55,95	0
fracción 16	1,18	1,5	1,77	37,20	62,80	0
fracción 17	1,08	1,5	1,62	32,47	67,53	0
fracción 18	0,76	1,5	1,14	29,88	70,12	0

ES 2 656 167 T3

fracción 19	0,67	1,5	1,01	35,55	64,45	0
fracción 20	0,41	1,5	0,62	28,90	71,10	0
fracción 21	0,29	1,5	0,44	25,31	74,69	0
fracción 22	0,21	1,5	0,32	23,60	76,40	0
fracción 23	0,20	1,5	0,30	46,16	53,84	0

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,79.

5 **Ejemplo 15**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), D-fructosa al 25 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

10

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,3	7,55	100,43	99,22	0,78	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 80	0,00	0	0	0
fracción 1	0,54	1,5	0,81	77,09	0,22	22,69
fracción 2	2,58	1,5	3,87	100	0	0
fracción 3	5,32	1,5	7,98	100	0	0
fracción 4	7,29	1,5	10,94	100	0	0
fracción 5	7,78	1,5	11,67	100	0	0
fracción 6	7,96	1,5	11,94	100	0	0
fracción 7	7,72	1,5	11,58	100	0	0
fracción 8	6,87	1,5	10,31	100	0	0
fracción 9	6,10	1,5	9,15	100	0	0
fracción 10	4,87	1,5	7,31	100	0	0
fracción 11	3,61	1,5	5,42	100	0	0
fracción 12	2,17	1,5	3,26	99,89	0,11	0
fracción 13	1,27	1,5	1,91	99,24	0,76	0
fracción 14	0,81	1,5	1,22	89,35	4,06	6,58
fracción 15	0,63	1,5	0,95	80,84	11,62	7,54
fracción 16	0,59	1,5	0,89	72,37	20,76	6,86
fracción 17	0,50	1,5	0,75	66,31	25,98	7,71
fracción 18	0,40	1,5	0,60	64,08	29,11	6,81
fracción 19	0,26	1,5	0,39	61,91	31,23	6,86

ES 2 656 167 T3

fracción 20	0,17	1,5	0,26	58,82	32,78	8,41
-------------	------	-----	------	-------	-------	------

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,90.

5 **Ejemplo 16**

Condiciones de cromatografía:

- Polipéptido: anticuerpo anti-IL17
- Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna
- Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía
- Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna
- Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0
- Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

10 El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	8,82	10,76	94,87	94,88	5,12	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,31	1,5	0,47	53,77	0	46,73
fracción 2	1,57	1,5	2,36	100	0	0
fracción 3	4,68	1,5	7,02	100	0	0
fracción 4	7,51	1,5	11,27	100	0	0
fracción 5	9,34	1,5	14,01	100	0	0
fracción 6	9,92	1,5	14,88	100	0	0
fracción 7	9,60	1,5	14,40	100	0	0
fracción 8	7,02	1,5	10,53	99,64	0,36	0
fracción 9	3,08	1,5	4,62	97,59	2,41	0
fracción 10	1,50	1,5	2,25	88,29	11,71	0
fracción 11	1,33	1,5	2,00	70,61	29,39	0
fracción 12	1,45	1,5	2,18	58,23	41,77	0
fracción 13	1,32	1,5	1,98	50,02	49,98	0
fracción 14	0,86	1,5	1,29	43,85	56,15	0
fracción 15	0,47	1,5	0,71	42,73	57,27	0
fracción 16	0,25	1,5	0,38	38,54	61,46	0

15 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,85.

Ejemplo 17

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido:	anticuerpo anti-CSF-1R
Solución de equilibrado:	tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna
Carga:	20 g de proteína/l material de cromatografía
Solución de lavado:	tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna
Solución de elución:	tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), glicina al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0
Procedimiento de elución:	gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

5

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,3	6,87	99,16	99,28	0,72	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,28	1,5	0,42	66,36	0,41	33,23
fracción 2	1,82	1,5	2,73	100	0	0
fracción 3	5,02	1,5	7,53	100	0	0
fracción 4	7,74	1,5	11,61	100	0	0
fracción 5	9,05	1,5	13,58	100	0	0
fracción 6	9,19	1,5	13,79	100	0	0
fracción 7	8,67	1,5	13,01	100	0	0
fracción 8	7,04	1,5	10,56	100	0	0
fracción 9	3,82	1,5	5,73	99,90	0,10	0
fracción 10	1,46	1,5	2,19	99,00	1,00	0
fracción 11	0,70	1,5	1,05	95,61	4,39	0
fracción 12	0,56	1,5	0,84	84,11	6,96	8,92
fracción 13	0,42	1,5	0,63	79,56	8,46	11,99
fracción 14	0,25	1,5	0,38	72,00	12,71	15,29

10 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,90.

Ejemplo 18**Condiciones de cromatografía:**

Polipéptido:	anticuerpo anti-IL17
Solución de equilibrado:	tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-prolina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna
Carga:	20 g de proteína/l material de cromatografía
Solución de lavado:	tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-

ES 2 656 167 T3

prolina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-prolina al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

5

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,36	10,6	93,51	94,97	5,03	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,26	1,5	0,39	58,65	0	41,35
fracción 2	0,95	1,5	1,43	100	0	0
fracción 3	2,58	1,5	3,87	100	0	0
fracción 4	4,75	1,5	7,13	100	0	0
fracción 5	6,24	1,5	9,36	100	0	0
fracción 6	7,22	1,5	10,83	100	0	0
fracción 7	7,96	1,5	11,94	100	0	0
fracción 8	7,97	1,5	11,96	100	0	0
fracción 9	7,35	1,5	11,03	100	0	0
fracción 10	5,76	1,5	8,64	100	0	0
fracción 11	2,89	1,5	4,34	98,95	1,05	0
fracción 12	1,18	1,5	1,77	94,31	5,69	0
fracción 13	0,68	1,5	1,02	80,42	19,58	0
fracción 14	0,63	1,5	0,95	68,26	31,74	0
fracción 15	0,72	1,5	1,08	50,87	49,13	0
fracción 16	0,84	1,5	1,26	60,95	39,05	0
fracción 17	0,90	1,5	1,35	75,25	24,75	0
fracción 18	0,81	1,5	1,22	78,25	21,75	0
fracción 19	0,59	1,5	0,89	79,58	20,42	0
fracción 20	0,38	1,5	0,57	73,76	26,24	0
fracción 21	0,24	1,5	0,36	75,45	24,55	0
fracción 22	0,16	1,5	0,24	76,72	23,28	0

10 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,83.

Ejemplo 19

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-prolina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-

ES 2 656 167 T3

prolina al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), L-prolina al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

5

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,3	7,31	97,20	99,33	0,67	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,51	1,5	0,77	67,91	0,38	31,71
fracción 2	2,31	1,5	3,47	100	0	0
fracción 3	4,90	1,5	7,35	100	0	0
fracción 4	6,60	1,5	9,90	100	0	0
fracción 5	7,41	1,5	11,12	100	0	0
fracción 6	7,70	1,5	11,55	100	0	0
fracción 7	7,87	1,5	11,81	100	0	0
fracción 8	7,21	1,5	10,82	100	0	0
fracción 9	6,14	1,5	9,21	100	0	0
fracción 10	4,35	1,5	6,53	100	0	0
fracción 11	2,13	1,5	3,20	99,89	0,11	0
fracción 12	0,83	1,5	1,25	99,16	0,84	0
fracción 13	0,38	1,5	0,57	79,11	5,30	15,59
fracción 14	0,27	1,5	0,41	63,62	16,62	19,76
fracción 15	0,24	1,5	0,36	46,29	27,44	26,27
fracción 16	0,18	1,5	0,27	68,51	31,49	20,66

10 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,97.

Ejemplo 20

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-IL17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

5

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,45	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,24	10,81	99,86	94,16	5,84	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,21	1,5	0,32	51,88	0	48,12
fracción 2	0,61	1,5	0,92	57,58	0	42,46
fracción 3	1,59	1,5	2,39	100	0	0
fracción 4	3,25	1,5	4,88	100	0	0
fracción 5	5,11	1,5	7,67	100	0	0
fracción 6	6,63	1,5	9,95	100	0	0
fracción 7	7,69	1,5	11,54	100	0	0
fracción 8	8,26	1,5	12,39	100	0	0
fracción 9	8,15	1,5	12,23	100	0	0
fracción 10	7,88	1,5	11,82	100	0	0
fracción 11	5,02	1,5	7,53	100	0	0
fracción 12	1,91	1,5	2,87	95,64	4,36	0
fracción 13	0,84	1,5	1,26	85,39	14,61	0
fracción 14	0,72	1,5	1,08	68,77	31,23	0
fracción 15	0,81	1,5	1,22	66,73	33,27	0
fracción 16	0,89	1,5	1,34	64,45	35,55	0
fracción 17	0,88	1,5	1,32	49,18	50,82	0
fracción 18	0,77	1,5	1,16	46,31	53,69	0
fracción 19	0,53	1,5	0,80	44,49	55,51	0
fracción 20	0,34	1,5	0,51	35,48	64,52	0
fracción 21	0,22	1,5	0,33	33,50	66,5	0
fracción 22	0,15	1,5	0,23	32,72	67,28	0

10 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,86.

Ejemplo 21**Condiciones de cromatografía:**

Polipéptido: anticuerpo anti-CSF-1R

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 3500 Da), betaína al 8 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

5

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]	fragmentos de anticuerpo (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	13,8	7,55	99,16	99,22	0,78	0
fracción no adsorbida	0,00	~ 90	0,00	0	0	0
fracción 1	0,33	1,5	0,50	71,12	0,40	28,48
fracción 2	1,61	1,5	2,42	100	0	0
fracción 3	4,31	1,5	6,47	100	0	0
fracción 4	6,58	1,5	9,87	100	0	0
fracción 5	7,75	1,5	11,63	100	0	0
fracción 6	8,30	1,5	12,45	100	0	0
fracción 7	8,40	1,5	12,60	100	0	0
fracción 8	8,13	1,5	12,20	100	0	0
fracción 9	7,34	1,5	11,01	100	0	0
fracción 10	5,40	1,5	8,10	100	0	0
fracción 11	2,61	1,5	3,92	99,82	0,18	0
fracción 12	0,92	1,5	1,38	98,56	1,44	0
fracción 13	0,42	1,5	0,63	92,33	7,67	0
fracción 14	0,34	1,5	0,51	88,25	11,75	0
fracción 15	0,32	1,5	0,48	85,93	14,07	0
fracción 16	0,24	1,5	0,36	82,38	17,62	0
fracción 17	0,17	1,5	0,26	77,09	22,91	0

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,86.

10

Ejemplo 22**Condiciones de cromatografía:**

Polipéptido: anticuerpo anti-IL13R17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 400 Da), sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 400 Da), sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 22,5 volúmenes de columna

El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

15

20

Tabla

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,76	10,8	105,00	93,34	6,66
fracción no adsorbida	0,00	~ 60	0,00	-	-
fracción 1	3,19	2,0	6,38	100	0
fracción 2	11,2	2,0	22,40	100	0
fracción 3	12,2	2,0	24,40	100	0
fracción 4	8,89	2,0	17,78	99,64	0,36
fracción 5	5,22	2,0	10,44	94,65	5,35
fracción 6	3,45	2,0	6,90	72,24	27,76
fracción 7	2,33	2,0	4,66	44,63	55,37
fracción 8	1,46	2,0	2,92	33,75	66,25
fracción 9	0,86	2,0	1,72	24,38	75,62
fracción 10	0,46	2,0	0,92	30,67	69,33
fracción 11	0,27	2,0	0,54	51,34	48,66
fracción 12	0,20	2,0	0,40	64,8	35,2
fracción 13	0,17	2,0	0,34	71,58	28,42
fracción 14	0,15	2,0	0,30	75,35	24,65

5 Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,57.

Ejemplo 23**Condiciones de cromatografía:**

Polipéptido: anticuerpo anti-IL13R17

Solución de equilibrado: tampón citrato de sodio 10 mM, ajustado a pH 5,0, 2 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 10.000 Da), sorbitol al 15 % (m/m), ajustado a pH 5,0, 4 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón citrato de sodio 10 mM, poli(etilenglicol) al 10 % (m/m) (MW 10.000 Da), sorbitol al 15 % (m/m), que comprende cloruro de sodio 750 mM, ajustado a pH 5,0

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 30 volúmenes de columna

10 El pico que contenía el anticuerpo se recogió en fracciones de 3 ml, que se analizaron para determinar el contenido de monómero y de agregado, así como el contenido de proteína de la célula hospedadora CHO y el contenido de ADN de la célula hospedadora CHO. El resultado del análisis se presenta en la siguiente tabla.

Tabla

15

muestra	concentración (UV280) [mg/ml] E = 1,47	volumen de la fracción [ml]	cantidad de anticuerpo [mg]	anticuerpo en forma monomérica (SEC) [%]	anticuerpo en forma de agregado (SEC) [%]
eluido de proteína A acondicionado	9,06	10,5	95,13	93,30	6,70
fracción no adsorbida	0,00	~ 100	0,00	-	-

ES 2 656 167 T3

fracción 1	0,27	2,0	0,54	100	0
fracción 2	0,56	2,0	1,12	100	0
fracción 3	1,04	2,0	2,08	100	0
fracción 4	1,59	2,0	3,18	100	0
fracción 5	2,09	2,0	4,18	100	0
fracción 6	2,46	2,0	4,92	100	0
fracción 7	2,78	2,0	5,56	100	0
fracción 8	3,03	2,0	6,06	100	0
fracción 9	3,06	2,0	6,12	100	0
fracción 10	3,15	2,0	6,30	100	0
fracción 11	3,06	2,0	6,12	100	0
fracción 12	3,04	2,0	6,08	100	0
fracción 13	3,21	2,0	6,42	100	0
fracción 14	2,85	2,0	5,70	100	0
fracción 15	2,52	2,0	5,04	99,46	0,54
fracción 16	1,07	2,0	2,14	92,89	7,11
fracción 17	0,48	2,0	0,96	74,81	25,19
fracción 18	0,33	2,0	0,66	49,32	50,68
fracción 19	0,30	2,0	0,60	22,75	77,25
fracción 20	0,28	2,0	0,56	25,32	74,68
fracción 21	0,27	2,0	0,54	17,5	82,5
fracción 22	0,28	2,0	0,56	17,29	82,71
fracción 23	0,28	2,0	0,56	13,47	86,53
fracción 24	0,28	2,0	0,56	17,42	82,58
fracción 25	0,27	2,0	0,54	14,09	85,91
fracción 26	0,27	2,0	0,54	15,36	84,64
fracción 27	0,24	2,0	0,48	11,57	88,43
fracción 28	0,23	2,0	0,46	13,01	86,99
fracción 29	0,19	2,0	0,38	12,61	87,39
fracción 30	0,14	2,0	0,28	13,29	86,71

Se determinó que la resolución del pico del monómero y el pico del agregado usando el programa PeakFit (Seasolve Software Inc.) era 0,70.

5 **Ejemplo 24**

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido: anticuerpo anti-Ang2/VEGF

Material de intercambio: Poros 50HS

Columna: 11 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, 23 ml de volumen

Caudal: 90 cm/h

Solución de equilibrado: tampón fosfato de sodio 40 mM, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna

Carga: 20 g de proteína/l material de cromatografía

Solución de lavado: tampón fosfato de sodio 40 mM, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna

Solución de elución: tampón fosfato de sodio 40 mM, ajustado a pH 7,5

Procedimiento de elución: gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 12 volúmenes de columna

10 El eluido de intercambio aniónico acondicionado se aplicó a una columna de cromatografía que contenía el material de cromatografía de intercambio catiónico. Después de la etapa de carga a un caudal de 90 cm/h, la columna se lavó con solución de lavado (3 volúmenes de columna). El anticuerpo se recuperó con un procedimiento de elución de gradiente lineal, por lo que el valor del pH se varió (aumentó) de 5,0 a 7,5.

El anticuerpo $\frac{3}{4}$ «coeluye» con el monómero de anticuerpo y se detectan dos picos de anticuerpo $\frac{3}{4}$.

Ejemplo 25

5

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido:	anticuerpo anti-Ang2/VEGF
Material de intercambio:	Poros 50HS
Columna:	11 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, 23 ml de volumen
Caudal:	90 cm/h
Solución de equilibrado:	tampón fosfato de sodio 40 mM, PEG 4000 al 5 %, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna
Carga:	20 g de proteína/l material de cromatografía
Solución de lavado:	tampón fosfato de sodio 40 mM, PEG 4000 al 5 %, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna
Solución de elución:	tampón fosfato de sodio 40 mM, PEG 4000 al 5 %, ajustado a pH 7,5
Procedimiento de elución:	gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 12 volúmenes de columna

10

El eluido de intercambio aniónico acondicionado se aplicó a una columna de cromatografía que contenía el material de cromatografía de intercambio catiónico. Después de la etapa de carga a un caudal de 90 cm/h, la columna se lavó con solución de lavado (3 volúmenes de columna). El anticuerpo se recuperó con un procedimiento de elución de gradiente lineal, por lo que el valor del pH se varió (aumentó) de 5,0 a 7,5.

Ejemplo 26

Condiciones de cromatografía:

Polipéptido:	anticuerpo anti-Ang2/VEGF
Material de intercambio:	Poros 50HS
Columna:	11 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, 23 ml de volumen
Caudal:	90 cm/h
Solución de equilibrado:	tampón fosfato de sodio 40 mM, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna
Carga:	20 g de proteína/l material de cromatografía
Solución de lavado:	tampón fosfato de sodio 40 mM, PEG 4000 al 10 %, glicina al 8 %, ajustado a pH 5,0, 3 volúmenes de columna
Solución de elución:	tampón fosfato de sodio 40 mM, PEG 4000 al 10 %, glicina al 8 %, ajustado a pH 7,5
Procedimiento de elución:	gradiente lineal de una solución de elución del 0 % (v/v) al 100 % (v/v) en 12 volúmenes de columna

15

El eluido de intercambio aniónico acondicionado se aplicó a una columna de cromatografía que contenía el material de cromatografía de intercambio catiónico. Después de la etapa de carga a un caudal de 90 cm/h, la columna se lavó con solución de lavado (3 volúmenes de columna). El anticuerpo se recuperó con un procedimiento de elución de gradiente lineal, por lo que el valor del pH se varió (aumentó) de 5,0 a 7,5.

20

En la Figura 6 se muestra la distribución de anticuerpo en forma monomérica, fragmento anticuerpo $\frac{3}{4}$ y anticuerpo en forma agregada en las fracciones recogidas de la cromatografía de intercambio catiónico del

anticuerpo anti-Ang2/VEGF en el material de cromatografía de intercambio catiónico. El anticuerpo en forma monomérica y el anticuerpo en forma agregada y el fragmento anticuerpo $\frac{3}{4}$ se separan.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica que comprende las siguientes etapas:
- 5
- aplicar una primera solución que comprende opcionalmente poli(etilenglicol) y sorbitol a un material cromatográfico de intercambio catiónico y equilibrar de ese modo el material,
 - aplicar la solución que comprende el anticuerpo de la clase IgG al material de cromatografía equilibrado y cargar de este modo el material de cromatografía,
 - producir el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica aplicando una solución al material cromatográfico que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol y desorbiendo/eluyendo de este modo el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica del material cromatográfico,
- 10
- 15 por lo que el poli(etilenglicol) tiene una concentración de un 10 % en peso y el sorbitol tiene una concentración de un 5 % a un 20 % en peso.
2. Un procedimiento para producir un anticuerpo de la preparación de la clase IgG con contenido reducido de proteína de la célula hospedadora que comprende las siguientes etapas:
- 20
- aplicar una primera solución que comprende opcionalmente poli(etilenglicol) y sorbitol a un material cromatográfico de intercambio catiónico y equilibrar de ese modo el material,
 - aplicar la solución que comprende el anticuerpo de la clase IgG al material de cromatografía equilibrado y cargar de este modo el material de cromatografía,
 - producir el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica aplicando una solución al material cromatográfico que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol y desorbiendo/eluyendo de este modo el anticuerpo de la clase IgG en forma monomérica del material cromatográfico,
- 25
- 30 por lo que el poli(etilenglicol) tiene una concentración de un 10 % en peso y el sorbitol tiene una concentración de un 5 % a un 20 % en peso.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el poli(etilenglicol) tiene una masa molecular de 3500 Da +/- 20 %.
- 35
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el anticuerpo monomérico tiene una masa molecular de 100 kDa a 200 kDa.
- 40
5. Un procedimiento para producir en forma monomérica un anticuerpo CrossMab de cuatro cadenas de longitud completa que comprende las siguientes etapas:
- 45
- a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo y recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo,
 - b) purificar el anticuerpo con un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico que comprende las siguientes etapas:
- 50
- aplicar una solución que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol a un material de cromatografía sobre el que se ha adsorbido un anticuerpo, por la que el anticuerpo de longitud completa de cuatro cadenas en forma monomérica permanece adsorbido sobre un material de cromatografía de intercambio iónico, y
 - recuperar el anticuerpo CrossMab de longitud completa de cuatro cadenas en forma monomérica del material de cromatografía de intercambio iónico aplicando una solución que comprende poli(etilenglicol) y sorbitol, por la que el poli(etilenglicol) tiene una concentración de un 10 % en peso y el sorbitol tiene una concentración de un 5 % a un 20 % en peso, y produciendo de ese modo el anticuerpo.
- 55
- 60

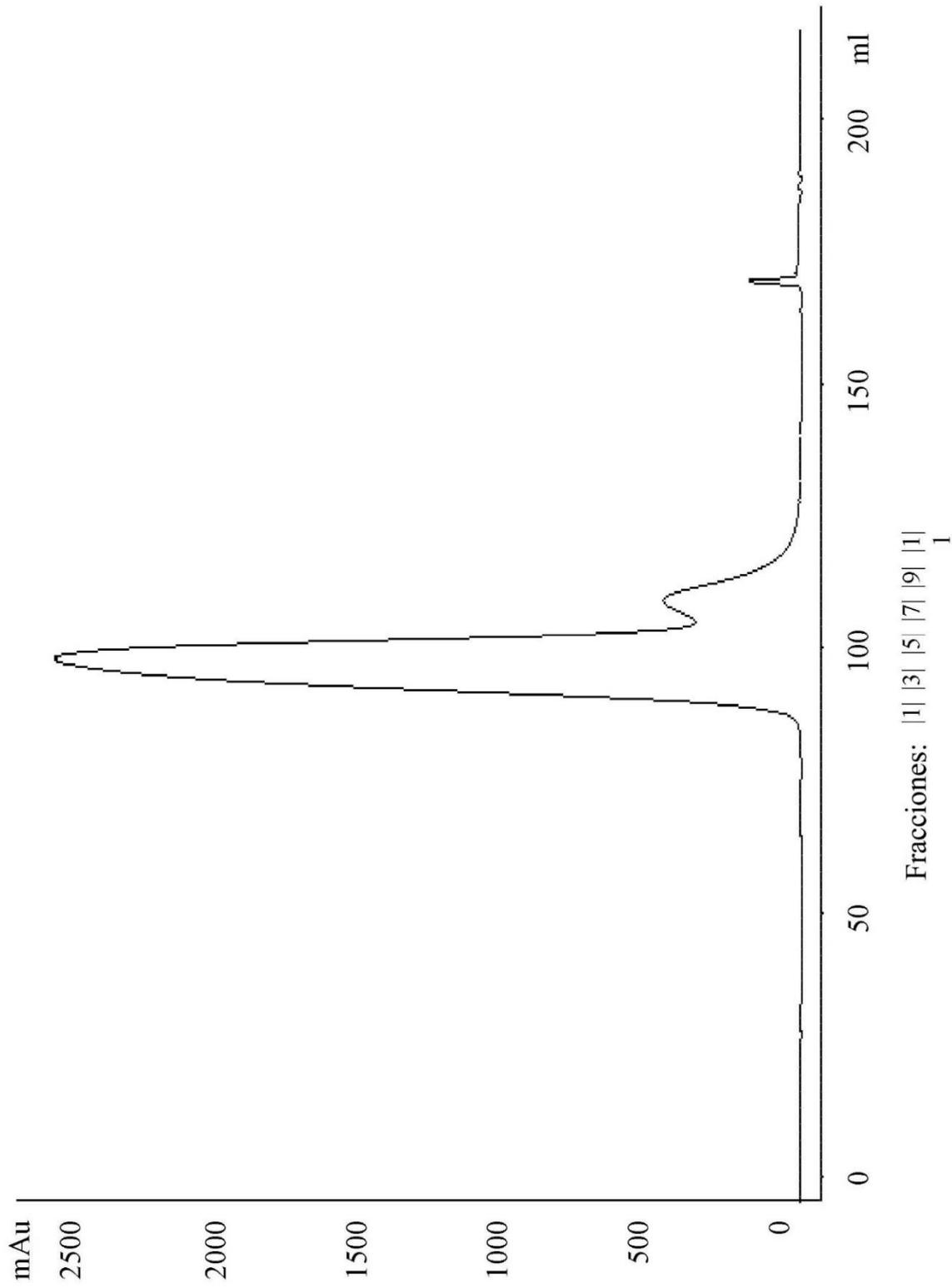


Fig. 1

Fig. 2

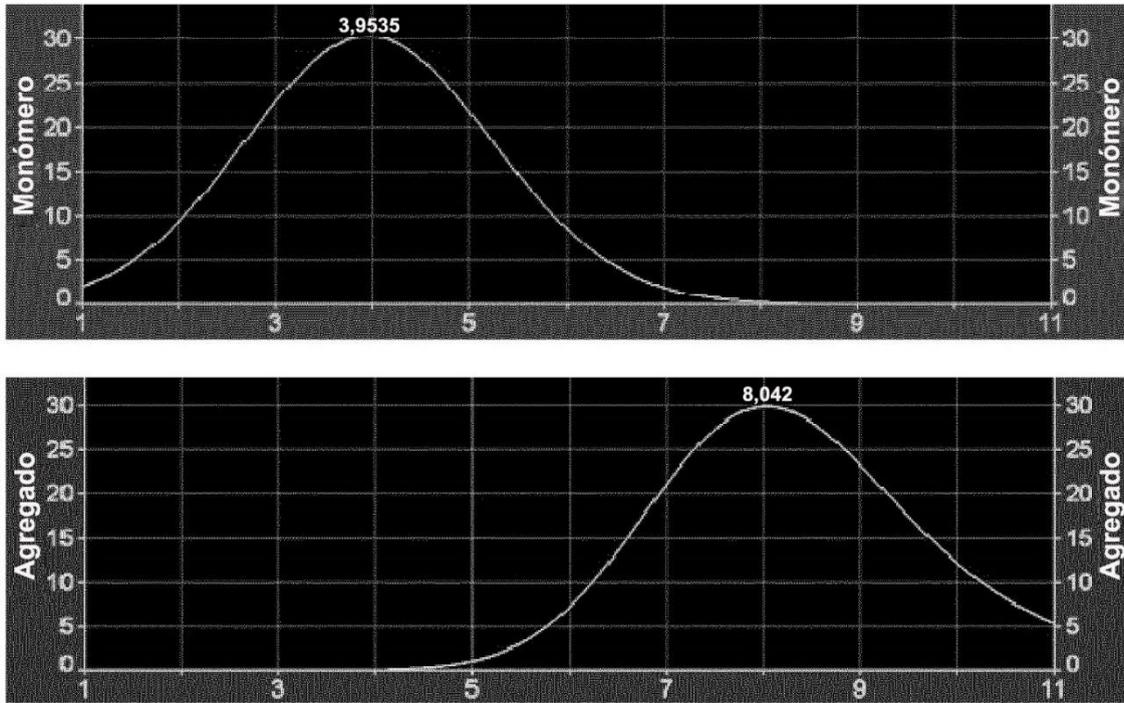
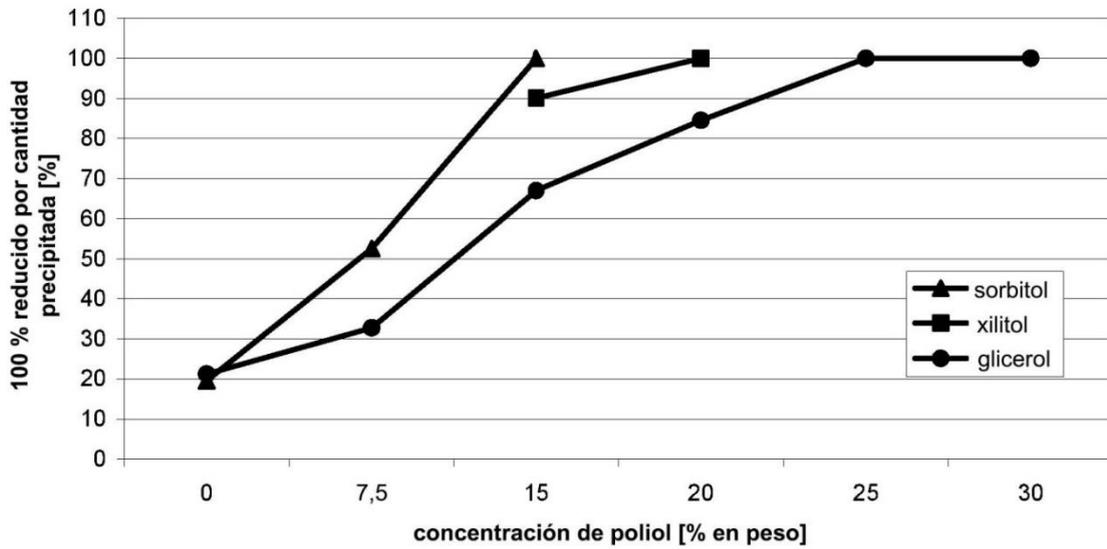


Fig. 3

solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da



solubilidad de un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da

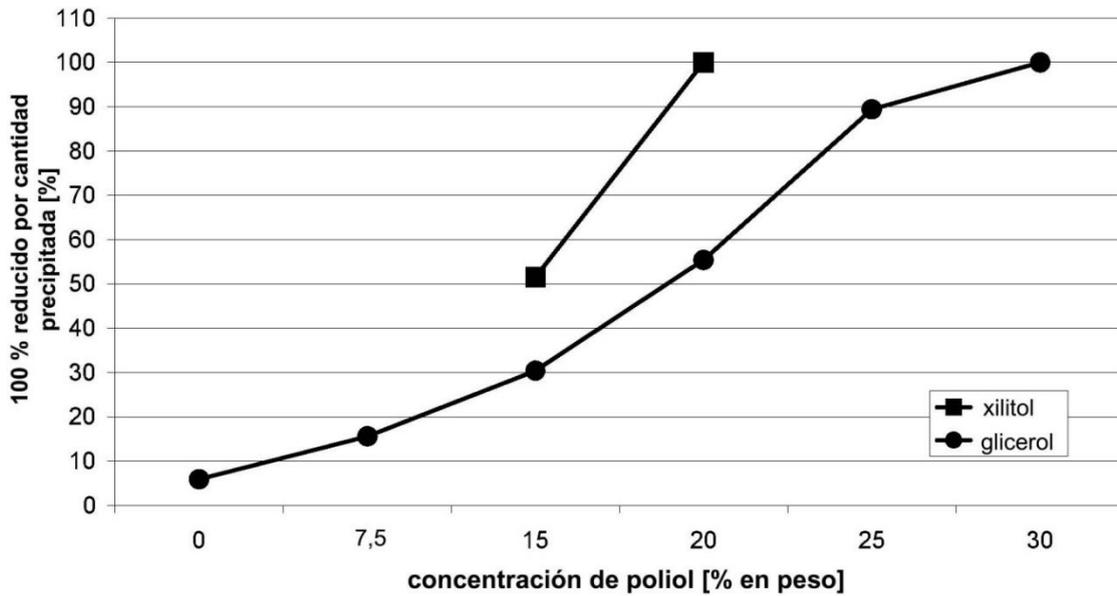
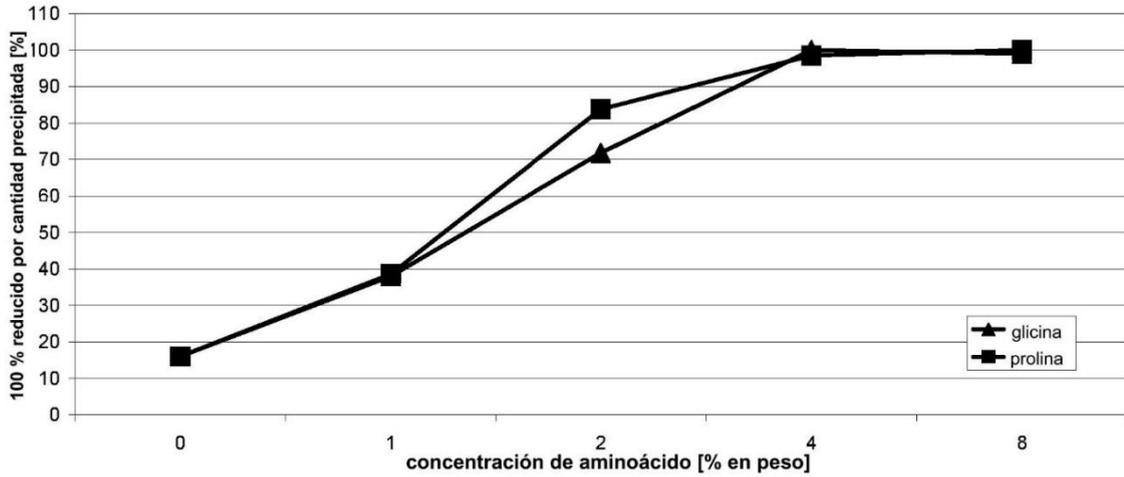


Fig. 4

solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da



solubilidad de un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da

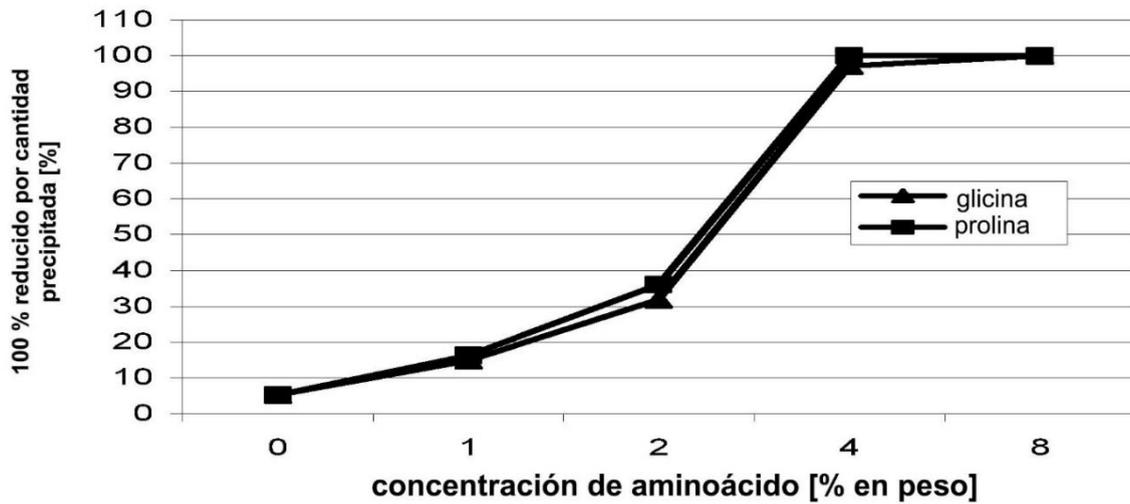
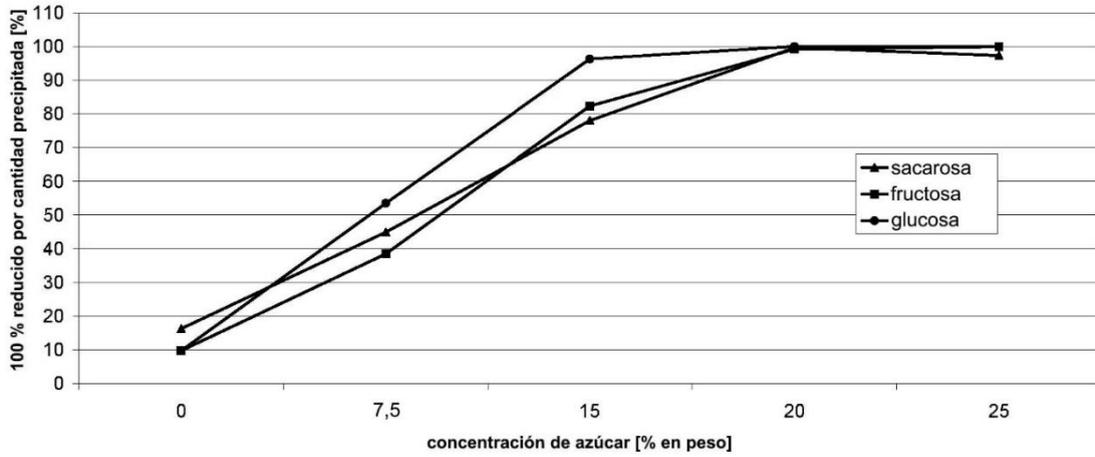


Fig. 5

solubilidad de un anticuerpo anti-IL17 en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da



solubilidad de un anticuerpo anti-CSF-1R en una solución que comprende un 10 % en peso de un poli(etilen)glicol de una masa molecular de 3500 Da

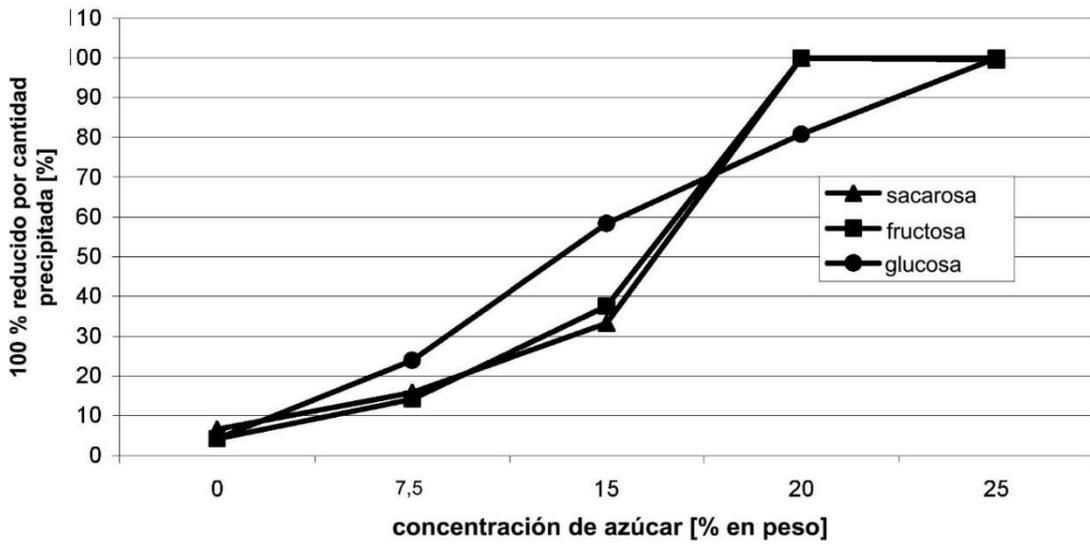


Fig. 6

