

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 645**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2014 PCT/EP2014/059246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180852**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2014 E 14722194 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2994485**

54 Título: **Proceso multietapa continuo para purificar anticuerpos**

30 Prioridad:

06.05.2013 EP 13305593

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

26.04.2018

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DUTHE, DIDIER;
HEMET, CÉLINE;
LANDRIC-BURTIN, LAURE y
MOTHES, BENOÏT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 665 645 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

Proceso multietapa continuo para purificar anticuerpos

CAMPO TÉCNICO

5 La invención se refiere a un proceso cromatográfico de tres etapas para una purificación a pequeña y gran escala de proteínas, especialmente anticuerpos monoclonales, utilizando cuatro soluciones tampón.

ANTECEDENTES

10 La purificación de anticuerpos puede ser uno de los aspectos más costosos de la bioproducción. Por lo general, los anticuerpos monoclonales (mAb) se purifican utilizando un proceso cromatográfico de tres etapas, con tres resinas, utilizando un sistema de tampón específico en cada etapa. Este proceso de purificación convencional abarca una etapa de captura, seguida por una etapa de intercambio iónico y concluye con una etapa de purificación final exhaustiva (*polishing*) y, normalmente, requiere de 3 a 5 días de trabajo (incluidos almacenamientos y fases abiertas). En tales procesos convencionales, estas tres etapas llevan a cabo en una secuencia de operaciones unitarias distintas, que no se puede llevar a cabo en un modo continuo ya que es necesario el ajuste del pH, molaridad y concentración proteica entre cada etapa. Un proceso de purificación convencional de este tipo se esquematiza en la Figura 5. En consecuencia, los procesos de purificación convencionales requieren por lo general numerosos tampones diferentes, así como también numerosas unidades de almacenamiento entre cada etapa discontinua. Estos procesos de purificación convencionales son, por lo tanto, propensos a contaminaciones, fallos técnicos y errores humanos. Además, ya que se necesita una interrupción entre cada etapa para concentrar el eluido, ajustar el pH y la conductividad y almacenar el eluido antes de la siguiente etapa, y ya que no se puede comenzar una etapa antes de completar la anterior, los procesos de purificación convencionales de este tipo son especialmente largos y caros, tal como se puede apreciar en la Figura 7.

25 Con la utilización de títulos de cultivos celulares crecientes y mayores volúmenes de cultivos celulares en la producción, el procesamiento posterior se considera como un cuello de botella en la industria. Esto es especialmente relevante para la producción de anticuerpos monoclonales, donde la atención se ha desplazado desde el volumen del lote hacia la capacidad del procesamiento posterior. Además, los estudios preclínicos tempranos y de fase clínica requieren cantidades más grandes de anticuerpos que se puedan producir con mayor rapidez. Por lo tanto, en la industria se necesita un proceso que se pueda llevar a cabo de modo continuo, para la purificación de anticuerpos, y para reducir el tiempo necesario para obtener lotes, los riesgos de contaminaciones, fallos técnicos y errores humanos y los requisitos del aumento a escala del proceso.

30 La solicitud internacional WO 2011/090719 divulga un método para purificar anticuerpos, comprendiendo dicho método dos o tres etapas cromatográficas, conllevando la primera etapa cromatográfica el uso de una columna con proteína A, conllevando la segunda etapa cromatográfica el uso de una columna cromatográfica de intercambio catiónico y conllevando la tercera etapa cromatográfica opcional el uso de una columna cromatográfica de intercambio aniónico.

35 La solicitud internacional WO 2009/111347 divulga la carga de una cromatografía con resina multimodal a un pH superior al utilizado convencionalmente en los tampones de elución de columnas con proteína A, lo que sugiere la necesidad de un intercambio de tampón entre las dos etapas cromatográficas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

40 Los inventores han descubierto un nuevo método para purificar anticuerpos, donde dicho método comprende un número limitado de etapas en un modo continuo, se utilizan cantidades reducidas de resinas y tampones a la vez que se hace posible obtener rendimientos elevados de anticuerpos purificados con un grado excelente de pureza. Por lo tanto, las proteínas purificadas son adecuadas para aplicaciones médicas. En consecuencia, el método se puede utilizar para purificar proteínas para ensayos clínicos y/o para comercializar una composición farmacéutica que comprende la proteína. Además, este método no necesita ningún ajuste entre etapas y, por lo tanto, se puede llevar a cabo en un sistema cerrado desde la recolección de las proteínas que se van a purificar hasta el producto final.

50 Resumiendo, este método comprende únicamente tres etapas cromatográficas en un modo continuo: una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico o con resina multimodal y una cromatografía de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés). Estas tres etapas cromatográficas se pueden implementar en cualquier orden. Además, se ha observado que todos los tampones utilizados durante estas tres etapas cromatográficas se pueden preparar a partir de la misma solución madre. Estos tampones comprenden convenientemente Bis Tris, por ejemplo, combinado con NaCl, ácido acético, agua y, opcionalmente, NH₄Cl. Como no se necesita ningún intercambio de tampón, el método es fácil de llevar a cabo y es sumamente adecuado para su automatización y/o para ejecutarlo en modo continuo. Más especialmente, es posible utilizar únicamente 4 tampones para todo el proceso, y garantizar así la compatibilidad entre todas las etapas y posibilitar ahorros en el control de calidad y producción de la cadena de suministro y reducir los requerimientos del almacenamiento.

El método de la invención permite además reducir o anular las fases abiertas (es decir, etapas donde se abre el sistema de purificación para llevar a cabo una operación manual tal como preparar la columna cromatográfica para un nuevo tampón, diluir la muestra o ajustar su pH), y reducir de esta manera el riesgo de contaminación y proporcionar la posibilidad de trabajar en un entorno menos clasificado. Además, ya que cada etapa cromatográfica del método divulgado en la presente puede utilizar resinas reutilizables o, sorprendentemente puede reutilizar adsorbentes de membranas desechables, se puede reanudar la secuencia de las tres etapas cromatográficas hasta obtener la cantidad deseada sin manipulación humana. En particular, todas las etapas cromatográficas del método divulgado en la presente se pueden implementar utilizando resinas que se pueden reutilizar al menos 100 veces o utilizando adsorbentes de membrana que se pueden reutilizar al menos 50 veces. Los inventores ciertamente demostraron que era posible utilizar el mismo adsorbente de membrana desechable durante al menos 50 ejecuciones sin perder estabilidad. Por lo tanto, los tiempos del ciclo del proceso se acortan, los requisitos de aumento a escala del proceso se minimizan y es posible reducir los gastos de operación y almacenamiento ya que los volúmenes de las resinas y tampones se pueden reducir y no es necesario almacenar después de un lote los adsorbentes de membrana desechables. Por lo tanto, el método de la invención permite tanto una producción rentable rápida de lotes como una reducción del tiempo de ocupación de los sistemas de purificación, tal como se puede observar en las Figuras 10 y 12, en comparación con las Figuras 9 y 11. Por lo tanto, es adecuado para el aumento a escala y purificación de proteínas recombinantes desde escala de laboratorio a industrial.

Se ha configurado e implementado un protocolo específico para cuatro anticuerpos diferentes. En este protocolo, el eluyente proteico crudo obtenido al final de la primera etapa cromatográfica se pasa directamente por la segunda matriz cromatográfica, en particular, por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, es decir, sin someterlo a ningún tratamiento como el ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución, y el eluido proteico obtenido al final de la segunda etapa cromatográfica también se pasa directamente por la tercera matriz cromatográfica, en particular, por la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, es decir, sin someterlo a ningún tratamiento como el ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución. Este método se esquematiza en la Figura 6. Además, en este protocolo, la solución que contiene la proteína se carga sobre la primera matriz cromatográfica, en particular sobre la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, en ejecuciones sucesivas (remítase al Ejemplo 6), comenzando las ejecuciones sucesivas tan pronto como el ciclo inicial se eluye de la primera etapa cromatográfica, tal como se puede observar en la Figura 8. Este protocolo tiene la ventaja de ser extremadamente rápido (aproximadamente 2 horas para una secuencia), conlleva una mejora del rendimiento (más de un 90%), una mejora de la pureza y permite reducir tanto los volúmenes de tampones como de resinas utilizados cuando se utilizan las columnas y reducir tanto las instalaciones para los tampones como de almacenamiento utilizados cuando se utilizan adsorbentes de membrana. Es más, este proceso tiene la ventaja de ser extremadamente flexible ya que el tamaño de las columnas utilizadas y/o el número de ejecuciones se puede adaptar fácilmente a la cantidad de proteínas que se va a purificar. Además, se puede automatizar completamente, ejecutar en un modo continuo y no comprende ninguna fase abierta. Es más, se llevó a cabo con éxito para cuatro anticuerpos diferentes sin necesitar optimización.

La divulgación divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende una primera etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una primera matriz cromatográfica, en particular por una primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar la solución por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el tampón de equilibración por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar tampón de lavado por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar tampón de equilibración por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, y eluir un eluyente proteico crudo de la primera matriz cromatográfica, en particular de la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, utilizando un primer tampón de elución; una segunda etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una segunda matriz cromatográfica, en particular por una segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el eluyente proteico crudo por la segunda matriz cromatográfica, en particular por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, opcionalmente pasar tampón de equilibración por la segunda matriz cromatográfica, en particular por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, y eluir un eluido proteico de la segunda matriz cromatográfica, en particular de la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, utilizando un segundo tampón de elución; y una tercera etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una tercera matriz cromatográfica, en particular por una tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el eluido proteico a través de la tercera matriz cromatográfica, en particular a través de la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, en el modo de flujo continuo, opcionalmente pasar tampón de lavado por la tercera matriz cromatográfica, en particular por la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, y recuperar proteína purificada del flujo continuo de la tercera matriz cromatográfica, en particular de la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención trata sobre un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:

- pasar dicha solución por una primera columna cromatográfica, siendo dicha primera columna cromatográfica una columna cromatográfica de afinidad que es una columna con proteína A;
 - eluir un eluyente proteico crudo de la primera columna cromatográfica utilizando un primer tampón de elución;
- 5 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
- pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda columna cromatográfica, siendo dicha segunda columna cromatográfica una columna cromatográfica con una resina multimodal;
 - eluir un eluido proteico de la segunda columna cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución; y
- 10 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
- pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera columna cromatográfica en el modo de flujo continuo, siendo dicha tercera columna cromatográfica una columna cromatográfica de intercambio aniónico;
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera columna cromatográfica;
- 15

donde cada uno de los tampones está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl, y donde dicho método se lleva a cabo en un modo continuo.

La divulgación también divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende una primera etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una primera matriz cromatográfica, en particular por una primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar una parte de la solución por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el tampón de equilibración por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar tampón de lavado por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar tampón de equilibración por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, eluir un eluyente proteico crudo de la primera matriz cromatográfica, en particular de la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, utilizando un primer tampón de elución, y opcionalmente pasar tampón de saneamiento por la primera matriz cromatográfica, en particular por la primera columna o adsorbente de membrana cromatográficos; una segunda etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una segunda matriz cromatográfica, en particular por una segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el eluyente proteico crudo por la segunda matriz cromatográfica, en particular por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, opcionalmente pasar tampón de equilibración por la segunda matriz cromatográfica, en particular por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, eluir un eluido proteico de la segunda matriz cromatográfica, en particular de la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos, utilizando un segundo tampón de elución, y opcionalmente pasar tampón de saneamiento por la segunda matriz cromatográfica, en particular por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos; y una tercera etapa cromatográfica que comprende pasar tampón de equilibración por una tercera matriz cromatográfica, en particular por una tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, pasar el eluido proteico a través de la tercera matriz cromatográfica, en particular a través de la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, en el modo de flujo continuo, opcionalmente pasar tampón de lavado por la tercera matriz cromatografía, en particular por la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, recuperar proteína purificada del flujo continuo de la tercera matriz cromatográfica, en particular de la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos, y opcionalmente pasar tampón de saneamiento por la tercera matriz cromatográfica, en particular por la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos; reanudar sucesivamente la primera, segunda y tercera etapas cromatográficas con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de la tercera etapa cromatográfica.

Tal como se divulga en la presente, cada uno de los tampones puede comprender Bis Tris. Tal como se divulga en la presente, cada tampón puede comprender Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl. El uso de tampones Bis Tris en el método de la invención es especialmente importante ya que permite evitar el ajuste del pH entre las tres etapas cromatográficas y, por lo tanto, ejecutar el método en un sistema cerrado desde la primera hasta la última etapa.

Tal como se divulga en la presente, una de las matrices cromatográficas puede ser una matriz con proteína A. Tal como se divulga en la presente, una de las matrices cromatográficas puede ser una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal. Tal como se divulga en la presente, una de las matrices cromatográficas puede ser una matriz de intercambio aniónico.

Tal como se divulga, el método de la invención puede comprender una matriz cromatográfica con proteína A, una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal y una matriz cromatográfica de intercambio aniónico, utilizándose dichas matrices en cualquier orden en las tres etapas cromatográficas.

Tal como se divulga en la presente, la primera matriz cromatográfica puede ser una matriz con proteína A, la segunda matriz cromatográfica una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal y la tercera matriz cromatográfica una matriz cromatográfica de intercambio aniónico.

5 En el contexto de la invención, cada matriz cromatográfica es una columna cromatográfica. En el contexto de la invención, la primera matriz cromatográfica es una columna con proteína A, la segunda matriz cromatográfica es una columna cromatográfica con una resina multimodal y la tercera matriz cromatográfica es una columna cromatográfica de intercambio aniónico.

10 Tal como se divulga en la presente, cada matriz cromatográfica puede ser un adsorbente de membrana cromatográfico. Tal como se divulga en la presente, la primera matriz cromatográfica puede ser un adsorbente de membrana con proteína A, la segunda matriz cromatográfica un adsorbente de membrana de intercambio catiónico y la tercera matriz cromatográfica un adsorbente de membrana de intercambio aniónico.

En una realización de la invención, la proteína que se está purificando es un anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 En una realización de la invención, el método comprende además una etapa de nanofiltración después de la etapa (c) y/o una etapa de ultrafiltración y diafiltración después de la etapa de nanofiltración. En otra realización de la invención, el método comprende además una etapa de inactivación a pH bajo después de la etapa (c), después de la etapa de nanofiltración y/o después de la etapa de ultrafiltración y diafiltración. En una realización de la invención, el método comprende, antes de la etapa (a), una etapa de cultivo celular en un medio de cultivo líquido, preferentemente en un biorreactor, para proporcionar un medio de cultivo líquido que contiene la proteína. Las células cultivadas pueden ser células de mamífero, bacterianas o de levaduras.

20 La invención, por lo tanto, también proporciona un proceso integrado para generar una proteína purificada a partir de un medio de cultivo líquido.

25 En ciertas realizaciones de la invención, el primer tampón de elución comprende Bis Tris 20 mM y NaCl 20 mM, ajustado a pH 3.7 con ácido acético; el segundo tampón de elución comprende Bis Tris 20 mM, NaCl 45 mM y NH₄Cl 25 mM ajustado a pH 7.25 con ácido acético; el tampón de equilibración comprende Bis Tris 20 mM y NaCl 20 mM, ajustado a pH 7.4 con ácido acético; y el tampón de lavado comprende Bis Tris 20 mM y NaCl 1 M ajustado a pH 7.4 con ácido acético. En otras realizaciones de la invención, el tampón de saneamiento comprende hidróxido de sodio 0.1 N.

30 La divulgación divulga un kit que comprende una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal, una matriz con proteína A y/o una matriz cromatográfica de intercambio aniónico; y al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl. Tal como se divulga, el kit se puede utilizar para purificar una proteína a partir de una solución utilizando un método tal como se divulga en la presente.

35 Tal como se divulga, el kit puede comprender una columna cromatográfica con una resina multimodal, una columna con proteína A y/o una columna cromatográfica de intercambio aniónico; y al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl.

Tal como se divulga, el kit puede comprender un adsorbente de membrana de intercambio catiónico, un adsorbente de membrana con proteína A y/o un adsorbente de membrana de intercambio aniónico; y al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl.

40 La divulgación divulga un kit que comprende una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal, una matriz con proteína A y/o una matriz cromatográfica de intercambio aniónico; e instrucciones para preparar al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl. Tal como se divulga, el kit se puede utilizar para purificar una proteína a partir de una solución utilizando un método tal como se divulga en la presente.

45 Tal como se divulga, el kit puede comprender una columna cromatográfica con una resina multimodal, una columna con proteína A y/o una columna cromatográfica de intercambio aniónico; e instrucciones para preparar al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl.

50 Tal como se divulga, el kit puede comprender un adsorbente de membrana de intercambio catiónico, un adsorbente de membrana con proteína A y/o un adsorbente de membrana de intercambio aniónico; e instrucciones para preparar al menos un tampón que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl.

55 La divulgación divulga además un método para preparar tampón de equilibración que comprende crear una solución de 100 L con una concentración final de Bis Tris 20 mM y NaCl 20 mM; ajustar el pH de la solución a 7.4 con ácido acético; y recoger 25 L de la solución. La divulgación también divulga un método para preparar tampón de lavado que comprende recoger 25 L de los 75 L restantes de la solución de preparación del tampón de equilibración y

añadir NaCl 1 M e.q. a estos 25 L de solución. La divulgación divulga además un método para preparar un tampón de elución que comprende recoger 25 L de los 50 L restantes de la solución de preparación del tampón de equilibración y ajustar el pH de estos 25 L de solución a 3.7 con ácido acético. La divulgación divulga además un método para preparar un tampón de elución que comprende añadir NaCl 45 mM e.q. y NH₄Cl 25 mM e.q. a los 25 L restantes de la solución de preparación del tampón de equilibración y ajustar el pH de estos 25 L a 7.25 con ácido acético. Los tampones preparados mediante los métodos divulgados en la presente se pueden utilizar para purificar una proteína a partir de una solución utilizando un método divulgado en la presente.

También se divulga en la presente proteínas aisladas, agentes farmacéuticos y composiciones farmacéuticas obtenidos mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente.

Estas y otras características y ventajas del método de purificación divulgado se entenderán de manera más completa a partir de la siguiente descripción detallada junto con las reivindicaciones adjuntas. Cabe señalar que el alcance de las reivindicaciones está definido por lo que se enuncia en ellas y no por la discusión específica de las características y ventajas expuestas en la descripción.

En el contexto de la invención, las expresiones «que comprende», «que tiene», «que incluye» y «que contiene» se deben interpretar como términos abiertos (es decir que significan «que incluye pero sin carácter limitante») a menos que se indique lo contrario. Adicionalmente, la expresión «que comprende» engloba «constituido por» (por ejemplo, una composición «que comprende» X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo más, por ejemplo, X+Y).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La siguiente descripción detallada de las realizaciones del método de purificación divulgado se puede entender mejor cuando se lee junto con las siguientes figuras.

La **Figura 1** muestra una representación esquemática del protocolo utilizado para formular los tampones del método de purificación divulgado en los Ejemplos 2 a 7.

La **Figura 2** muestra gráficos que representan los puntos óptimos para el segundo tampón de elución para tres concentraciones de NH₄Cl.

La **Figura 3** muestra gráficos que representan el análisis de la tendencia de HMW (siglas en inglés de peso molecular elevado), rendimiento, HCP (siglas en inglés de proteínas de la célula hospedadora) y ADN en cada una de las 15 ejecuciones del Ejemplo 5.

La **Figura 4** muestra gráficos que representan el análisis de la tendencia de HMW, LMW (siglas en inglés de peso molecular bajo), HCP y ADN en cada uno de las 50 ejecuciones del Ejemplo 8.

La **Figura 5** muestra una representación esquemática de diferentes etapas de un proceso convencional para purificar proteínas. BH: recolección a granel; EqB#1: primer tampón de equilibración; WB#1: primer tampón de lavado, EIB#1: primer tampón de elución; EqB#2: segundo tampón de equilibración; WB#2: segundo tampón de lavado, EIB#2: segundo tampón de elución; EqB#3: tercer tampón de equilibración; WB#3: tercer tampón de lavado; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; ajust. pH: ajuste del pH; ajust. conc.: ajuste de la concentración; ajust. conduct.: ajuste de la conductividad; muest.: muestreo; alm.: almacenamiento; filt.: filtración; Nanofilt.: nanofiltración; TFF: filtración con flujo tangencial.

La **Figura 6** muestra una representación esquemática de diferentes etapas del método de la invención. BH: recolección a granel; EqB#1: primer tampón de equilibración; WB#1: primer tampón de lavado, EIB#1: primer tampón de elución; EIB#2: segundo tampón de elución; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; muest.: muestreo; alm.: almacenamiento; Nanof.: nanofiltración; TFF: filtración con flujo tangencial.

La **Figura 7** muestra una representación esquemática de diferentes etapas de un proceso convencional para purificar proteínas que incluye varias ejecuciones o ciclos. Clar.: clarificación; EqB#1: primer tampón de equilibración; WB#1: primer tampón de lavado, EIB#1: primer tampón de elución; EqB#2: segundo tampón de equilibración; WB#2: segundo tampón de lavado, EIB#2: segundo tampón de elución; EqB#3: tercer tampón de equilibración; WB#3: tercer tampón de lavado; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración.

La **Figura 8** muestra una representación esquemática de diferentes etapas del método de la invención que incluye varias ejecuciones o ciclos. Clar.: clarificación; EqB#1: primer tampón de equilibración; WB#1: primer tampón de lavado, EIB#1: primer tampón de elución; EIB#2: segundo tampón de elución; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración.

5 La **Figura 9** muestra una representación esquemática de una línea temporal de diferentes etapas de un proceso convencional para purificar proteínas que incluye varias ejecuciones o ciclos. La primera línea de la tabla muestra el tiempo en horas. Clar.: clarificación; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; inact. pH bajo: inactivación por pH bajo; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración. El círculo representa el tiempo en el que se completa el proceso.

La **Figura 10** muestra una representación esquemática de una línea temporal de diferentes etapas del método de la invención que incluye varias ejecuciones o ciclos. Clar.: clarificación; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración. El círculo representa el tiempo en el que se completa el proceso.

10 La **Figura 11** muestra una representación esquemática de una línea temporal de diferentes etapas de un proceso convencional para purificar proteínas que incluye varias ejecuciones o ciclos. La primera línea de la tabla muestra el tiempo en horas. Clar.: clarificación; crom1: primera etapa cromatográfica; crom2: segunda etapa cromatográfica; crom3: tercera etapa cromatográfica; inact. pH bajo: inactivación por pH bajo; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración. Se indica el nivel estimado de productividad del proceso.

15 La **Figura 12** muestra una representación esquemática de una línea temporal de diferentes etapas del método de la invención que incluye varias ejecuciones o ciclos. Clar.: clarificación; cr1: primera etapa cromatográfica; cr2: segunda etapa cromatográfica; cr3: tercera etapa cromatográfica; Nanof.: nanofiltración; UF/DF: ultrafiltración/diafiltración. Se indica el nivel estimado de productividad del proceso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ASPECTOS Y REALIZACIONES

20 Basándose en la disponibilidad de resinas de modo mixto (también denominada resinas multimodales) y adsorbentes de membrana cromatográficos, los inventores han desarrollado un nuevo proceso de purificación utilizando únicamente tres etapas cromatográficas. En otras palabras, el método comprende únicamente tres etapas que conllevan un paso por una matriz cromatográfica.

25 La divulgación divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar dicha solución por una primera matriz cromatográfica;
 - eluir un eluyente proteico crudo de la primera matriz cromatográfica utilizando un primer tampón de elución;
- 30 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda matriz cromatográfica;
 - eluir un eluido proteico de la segunda matriz cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución; y
- 35 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera matriz cromatográfica en el modo de flujo continuo;
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera matriz cromatográfica;

donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

40 Más específicamente, cada una de las dos primeras etapas cromatográficas anteriores puede comprender o estar constituida por:

- el paso del tampón de equilibración por la matriz cromatográfica;
- el paso de la solución o el eluyente proteico crudo por la matriz cromatográfica (tal como se ha mencionado anteriormente);
- 45 - el paso del tampón de equilibración por la matriz cromatográfica;
- opcionalmente el paso del tampón de lavado por la matriz cromatográfica;
- opcionalmente el paso del tampón de equilibración por la matriz cromatográfica;
- la elución del eluyente proteico crudo o el eluido proteico de la matriz cromatográfica utilizando un tampón de elución (tal como se ha mencionado anteriormente),

50 donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

La divulgación también divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar una parte de dicha solución por una primera matriz cromatográfica;

- eluir un eluyente proteico crudo de la primera matriz cromatográfica utilizando un primer tampón de elución, y
- opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la primera matriz cromatográfica;
- 5 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda matriz cromatográfica,
 - eluir un eluido proteico de la segunda matriz cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la segunda matriz cromatográfica;
- 10 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera matriz cromatográfica en el modo de flujo continuo,
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera matriz cromatográfica, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la tercera matriz cromatográfica;
- 15 reanudar sucesivamente las etapas (a), (b) y (c) con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de cada etapa (c);

donde cada uno de los tampones de equilibración, de lavado y de elución comprende Bis Tris.

20 Tal como se divulga en la presente, la expresión «matriz cromatográfica» se refiere a cualquier tipo de medio sorbente particulado, resina u otra fase sólida, tal como una membrana, que, en un proceso de purificación, actúa como el adsorbente para separar la molécula que se va a purificar de otras moléculas presentes en una mezcla. La matriz, en particular las matrices constituidas por resinas, puede estar en forma de columnas o en forma de adsorbentes de membrana.

25 Tal como se divulga en la presente, un «adsorbente de membrana» se refiere a una lámina plana de polímero acrílico que porta grupos iónicos y comprende grupos funcionales incorporados tales como grupos de afinidad y grupos de intercambio iónico. Una de las diferencias entre resina y membrana es la distribución del flujo: mediante difusión para la resina y mediante convección en las membranas.

En el método de la invención, la primera, segunda y tercera matrices cromatográficas son columnas cromatográficas. Tal como se divulga en la presente, la primera, segunda y tercera matrices cromatográficas pueden ser adsorbentes de membrana cromatográficos.

30 Por consiguiente, tal como se divulga en la presente, la divulgación divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar dicha solución por una primera columna cromatográfica;
 - eluir un eluyente proteico crudo de la primera columna cromatográfica utilizando un primer tampón de elución;
- 35 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda columna cromatográfica,
 - eluir un eluido proteico de la segunda columna cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución; y
- 40 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera columna cromatográfica en el modo de flujo continuo,
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera columna cromatográfica;

45 donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

Más específicamente, cada una de las dos primeras etapas cromatográficas anteriores puede comprender o estar constituida por:

- el paso del tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
- el paso de la solución o el eluyente proteico crudo por la columna cromatográfica (tal como se ha mencionado anteriormente);
- el paso del tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
- opcionalmente el paso del tampón de lavado por la columna cromatográfica;
- opcionalmente el paso del tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
- la elución del eluyente proteico crudo o el eluido proteico de la columna cromatográfica utilizando un tampón de elución (tal como se ha mencionado anteriormente),

55 donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

La divulgación también divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- 5 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar una parte de dicha solución por una primera columna cromatográfica;
 - eluir un eluyente proteico crudo de la primera columna cromatográfica utilizando un primer tampón de elución, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la primera columna cromatográfica;
- 10 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda columna cromatográfica,
 - eluir un eluido proteico de la segunda columna cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la segunda columna cromatográfica;
- 15 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera columna cromatográfica en el modo de flujo continuo,
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera columna cromatográfica, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por la tercera columna cromatográfica;

reanudar sucesivamente las etapas (a), (b) y (c) con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y
 20 recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de cada etapa (c);

donde cada uno de los tampones de equilibración, de lavado y de elución comprende Bis Tris.

La divulgación también divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- 25 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar dicha solución por un primer adsorbente de membrana cromatográfico;
 - eluir un eluyente proteico crudo del primer adsorbente de membrana cromatográfico utilizando un primer tampón de elución;
- 30 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por un segundo adsorbente de membrana cromatográfico;
 - eluir un eluido proteico del segundo adsorbente de membrana cromatográfico utilizando un segundo tampón de elución, y
- 35 (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de un tercer adsorbente de membrana cromatográfico en el modo de flujo continuo;
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo del tercer adsorbente de membrana cromatográfico;

donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

Más específicamente, cada una de las dos primeras etapas cromatográficas anteriores puede comprender o estar
 40 constituida por:

- el paso del tampón de equilibración por el adsorbente de membrana cromatográfico;
- el paso de la solución o el eluyente proteico crudo por el adsorbente de membrana cromatográfico (tal como se ha mencionado anteriormente);
- 45 - el paso del tampón de equilibración por el adsorbente de membrana cromatográfico;
- opcionalmente el paso del tampón de lavado por el adsorbente de membrana cromatográfico;
- opcionalmente el paso del tampón de equilibración por el adsorbente de membrana cromatográfico;
- la elución del eluyente proteico crudo o el eluido proteico del adsorbente de membrana cromatográfico utilizando un tampón de elución (tal como se ha mencionado anteriormente),

50 donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

La divulgación también divulga un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende o está constituido por:

- 55 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar una parte de dicha solución por un primer adsorbente de membrana cromatográfico;
 - eluir un eluyente proteico crudo del primer adsorbente de membrana cromatográfico utilizando un primer tampón de elución, y

- opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por el primer adsorbente de membrana cromatográfico;
- (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por un segundo adsorbente de membrana cromatográfico,
 - eluir un eluido proteico del segundo adsorbente de membrana cromatográfico utilizando un segundo tampón de elución, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por el segundo adsorbente de membrana cromatográfico;
- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 - pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de un tercer adsorbente de membrana cromatográfico en el modo de flujo continuo,
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo del tercer adsorbente de membrana cromatográfico, y
 - opcionalmente, pasar tampón de saneamiento por el tercer adsorbente de membrana cromatográfico;

reanudar sucesivamente las etapas (a), (b) y (c) con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de cada etapa (c);

donde cada uno de los tampones de equilibración, de lavado y de elución comprende Bis Tris.

- 20 Tal como se ha indicado anteriormente, el método anterior de la invención únicamente comprende tres etapas cromatográficas. Aun cuando el método de acuerdo con la invención únicamente comprende tres etapas cromatográficas, permite obtener proteínas purificadas que son adecuadas para fines farmacéuticos y, en particular, para la administración a seres humanos.

- 25 Además de la ausencia de manipulación humana en el proceso de purificación (y la reducción consiguiente en el tiempo global requerido para finalizar el proceso de purificación), el método divulgado reduce la cantidad de tampones y resinas utilizada para la purificación. Además, los principales tampones comprenden los mismos componentes (es decir, Bis Tris, NaCl, ácido acético, agua y opcionalmente NH_4Cl), lo que facilita en gran medida la preparación del tampón. El método de purificación divulgado también simplifica la purificación de mAb, mejora el rendimiento global y reduce las materias primas, instalaciones para el almacenamiento, coste de los productos y tiempo del proceso, además de permitir la purificación de varios mAb.

- 35 A diferencia de los métodos de purificación de proteínas convencionales, tal como se ha mencionado anteriormente, el método divulgado en la presente utiliza cuatro o cinco tampones: un tampón de equilibrio, un tampón de lavado, dos tampones de elución y opcionalmente un tampón de saneamiento. Los cuatro tampones principales utilizados en el método divulgado se preparan con la misma matriz de compuestos, a partir de una solución madre, lo que facilita sumamente la preparación del tampón.

- 40 La expresión «tampones tal como se divulgan en la presente», tal como se utiliza en la presente, se refiere a los tampones que comprenden Bis Tris. Bis Tris es un compuesto muy conocido por los expertos en la técnica, cuyo nombre IUPAC es 2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol y cuyo número CAS es 6976-37-0. Los tampones del tipo divulgado en la presente pueden corresponder a un tampón de equilibrio, un tampón de lavado y/o a un tampón de elución.

- 45 Más específicamente, los tampones del tipo divulgado en la presente pueden comprender o estar constituidos por concentraciones variables de los mismos agentes químicos (siendo uno de ellos Bis Tris). Tal como se divulgan en la presente, los tampones pueden comprender o estar constituidos por Bis Tris, ácido acético y agua. Tal como se divulga en la presente, los tampones pueden comprender o estar constituidos por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH_4Cl . En otras palabras, los tampones de este tipo comprenden o están constituidos por concentraciones variables de Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH_4Cl .

- 50 Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender o estar constituido por Bis Tris de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) y NaCl de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM), ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 (por ejemplo, 3.7) con ácido acético. Un tampón de elución de este tipo es particularmente adecuado para su uso con una matriz cromatográfica de afinidad, en particular con una columna de afinidad o adsorbente de membrana cromatográficos, tal como una matriz con proteína A, en particular una columna con proteína A o un adsorbente de membrana con proteína A.

- 55 El tampón de elución también puede comprender o estar constituido por Bis Tris de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM), NaCl de 40 a 50 mM (por ejemplo, 45 mM) y NH_4Cl de 20 a 30 mM (por ejemplo, 25 mM), ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.25) con ácido acético. Un tampón de elución de este tipo es especialmente para su uso con una matriz cromatográfica con una resina multimodal, en particular con una columna cromatográfica con una resina multimodal, tal como, por ejemplo, Capto MMC.

- 5 El tampón de elución también puede comprender o estar constituido por Bis Tris de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM), NaCl de 50 a 150 mM (por ejemplo, 80 mM) y NH₄Cl de 20 a 30 mM (por ejemplo, 25 mM), ajustado a un pH comprendido entre 6 y 7 (por ejemplo, 6.2) con ácido acético. Un tampón de elución de este tipo es especialmente para su uso con una matriz cromatográfica de intercambio catiónico, en particular con un absorbente de membrana de intercambio catiónico.
- El tampón de equilibración puede comprender o estar constituido por Bis Tris de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) y NaCl de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM), ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.4) con ácido acético.
- 10 El tampón de lavado puede comprender o estar constituido por Bis Tris de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) y NaCl de 0.9 a 1.1 M (por ejemplo, 1 M), ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.4) con ácido acético.
- Más específicamente, un tampón de equilibración para su uso en el método divulgado contiene Bis Tris 20 mM y NaCl 20 mM, ajustado a pH 7.4 con ácido acético 2 mM. Un tampón de lavado para su uso en el método divulgado contiene Bis Tris 20 mM y NaCl 1 M, ajustado a pH 7.4 con ácido acético 2 mM. Un primer tampón de elución para su uso en el método divulgado contiene Bis Tris 20 mM y NaCl 20 mM, ajustado a pH 3.7 con ácido acético 275 mM.
- 15 Un segundo tampón de elución para su uso en el método divulgado contiene Bis Tris 20 mM, NaCl 45 mM y NH₄Cl 25 mM ajustado a pH 7.25 con ácido acético 5 mM, en particular para su uso con una columna cromatográfica con una resina multimodal, o contiene Bis Tris 20 mM, NaCl 80 mM y NH₄Cl 25 mM ajustado a pH 6.2 con ácido acético 5 mM, en particular para su uso con un adsorbente de membrana de intercambio catiónico.
- 20 Las ventajas de las formulaciones de tipo tampón anteriores incluyen la capacidad de un producto de tipo mAb para pasar a través de las tres matrices cromatográficas, en particular, las tres columnas cromatográficas o los tres adsorbentes de membrana cromatográficos, que se utilizan en el método divulgado con una compatibilidad más grande, a la vez que se minimizan interacciones no deseadas, se limitan las caídas de pH y conductividad, y se favorece un mayor rendimiento frente a los métodos de purificación tradicionales. Además de utilizar un número reducido de tampones, otro aspecto del método divulgado es el uso de un tampón de Bis-Tris. El uso de un tampón
- 25 de este tipo evita ajustar el pH entre las tres etapas cromatográficas y, por lo tanto, permite ejecutar el método en un sistema cerrado desde la recolección hasta la última etapa de purificación.
- El tampón de saneamiento utilizado opcionalmente en el contexto de la invención puede comprender o estar constituido por NaOH de 0.05 N a 0.15 N (por ejemplo, 0.1 N). Un tampón de saneamiento de este tipo es especialmente adecuado para su uso con una matriz cromatográfica de afinidad, en particular con una columna
- 30 cromatográfica de afinidad tal como una columna con proteína A o con un adsorbente de membrana cromatográfico de afinidad tal como el adsorbente de membrana con proteína A Sartobind, con una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal, en particular con una columna cromatográfica con una resina multimodal, tal como Capto MMC, o con un adsorbente de membrana cromatográfico de intercambio catiónico, tal como el adsorbente de membrana Sartobind S, y/o con una matriz cromatográfica de intercambio aniónico, en
- 35 particular con una columna cromatográfica de intercambio aniónico, tal como BioPro Q75, o con un adsorbente de membrana cromatográfico de intercambio aniónico, tal como el adsorbente de membrana Sartobind Q.
- Los términos «polipéptido» o «proteína» tal como se utilizan en la presente se refieren a:
- 1) moléculas que tienen la secuencia de las proteínas nativas, es decir, a) proteínas producidas mediante células de origen natural y específicamente no recombinantes, o b) células modificadas genéticamente o recombinantes, o
- 40 2) moléculas que difieren de la secuencia de las proteínas nativas por deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos y/o en al menos una modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación).
- Las moléculas mencionadas en el párrafo 1) anteriormente se pueden denominar proteínas nativas.
- Las moléculas mencionadas en el párrafo 2) anteriormente son proteínas no naturales.
- En ciertos aspectos, la proteína que se va a purificar es un anticuerpo.
- 45 El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión de este que compete con el anticuerpo intacto por la unión específica. Los fragmentos de unión incluyen, sin carácter limitante, F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv y anticuerpos monocatenarios. La expresión «cadena pesada» incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene suficiente secuencia de la región variable para conferir especificidad por un antígeno.
- 50 La expresión «cadena pesada», tal como se utiliza en la presente engloba una cadena pesada completa y fragmentos de esta. Una cadena pesada completa incluye un dominio de la región variable, VH, y tres dominios de la región constante, CH1, CH2 y CH3. El dominio VH está en el extremo amino del polipéptido y el dominio CH3 está en el extremo carboxilo.

La expresión «cadena ligera», tal como se utiliza en la presente engloba una cadena ligera completa y fragmentos de esta. Una cadena ligera completa incluye un dominio de la región variable, VL, y un dominio de la región constante CL. Al igual que la cadena pesada, el dominio de la región variable de la cadena ligera está en el extremo amino del polipéptido. La expresión «cadena ligera», tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene suficiente secuencia de la región variable para conferir especificidad por un antígeno.

Las unidades estructurales del anticuerpo de origen natural comprenden normalmente un tetrámero. Cada uno de estos tetrámeros está compuesto normalmente por dos pares idénticos de cadenas peptídicas, teniendo cada par una cadena ligera completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena pesada completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena ligera y pesada incluye normalmente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es normalmente responsable de reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define normalmente una región constante responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluidas, sin carácter limitante, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, sin carácter limitante, IgM1 e IgM2. IgA está igualmente subdividida en subclases que incluyen, sin carácter limitante, IgA1 e IgA2. En las cadenas ligera y pesada completas normalmente las regiones variables y constantes están unidas por una región «J» de aproximadamente 12 o más aminoácidos, donde la cadena pesada también incluye una región «D» de aproximadamente 10 aminoácidos más.

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman normalmente el sitio de unión al antígeno. Las regiones variables muestran normalmente la misma estructura general de regiones de armazón (FR, por sus siglas en inglés) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas normalmente por las regiones de armazón, lo que puede permitir la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, ambas regiones variables de la cadena ligera y pesada comprenden normalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está normalmente de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., Publicación de NIH N.º 91-3242. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es normalmente un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes.

Un fragmento F(ab) comprende una cadena ligera y la CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento F(ab') contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂. La región Fv comprende las regiones variables tanto de la cadena pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes. Los anticuerpos monocatenarios son moléculas Fv en las cuales las regiones variables de la cadena pesada y ligera se han conectado mediante un conector flexible para formar una única cadena polipeptídica, la cual forma una región de unión al antígeno. Se entiende que, en ciertas realizaciones, un anticuerpo bivalente que no es un anticuerpo «multiespecífico» o «multifuncional» comprende sitios de unión que tienen una especificidad antigénica idéntica.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) que se pueden purificar mediante el método divulgado se pueden producir mediante diversas técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación celular somática estándar de uso común en la técnica. Aunque, en principio, se prefieren los procedimientos de hibridación celular somática, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede corresponder un anticuerpo murino, quimérico, humanizado o completamente humano.

En una realización específica, el anticuerpo purificado por el método de la invención es un anticuerpo monoclonal seleccionado a partir del grupo constituido por un anticuerpo que se une específicamente a la forma protofibrilar de la proteína β-amiloide humana (por ejemplo, un anticuerpo humanizado), un anticuerpo que se une específicamente al polisacárido de la superficie bacteriana poli-N-acetilglucosamina (PNAG, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, un anticuerpo totalmente humano), un anticuerpo que se une específicamente a la molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5, por sus siglas en inglés) y un anticuerpo que se une específicamente a la glicoproteína transmembrana CD38 (por ejemplo, un anticuerpo humanizado).

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos que se pueden purificar mediante el método de la invención también comprenden: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, apolizumab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, biciromab, canakinumab, cetuximab, daclizumab, densusab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, ertumaxomab, etaracizumab, etanercept, golimumab, infliximab, natalizumab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, trastuzumab, dupilumab, sarilumab o fresolimumab.

En ciertos aspectos, la proteína que se va a purificar es una enzima.

5 Los ejemplos no limitantes de enzima que se pueden purificar mediante el método de la invención comprenden α -glucosidasa ácida, α -L-iduronidasa, iduronato-sulfatasa, heparán-*N*-sulfatasa, galactosa-6-sulfatasa, β -galactosidasa ácida, β -glucuronidasa, *N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, α -*N*-acetilgalactosaminidasa (*a*-galactosidasa B), lipasa ácida, ceramidasa ácida lisosomal, esfingomielinasa ácida, β -glucosidasa, galactosilceramidasa, α -galactosidasa A, β -galactosidasa ácida, β -galactosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa A o hexosaminidasa B.

Otros ejemplos no limitantes de proteínas que se pueden purificar mediante el método de la invención comprenden la eritropoyetina humana, factor de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF- α , TNF- β o TNF-K), interferón alfa o interferón beta.

10 La solución que contiene la proteína que se va a purificar puede ser un medio de cultivo, preferentemente un medio de cultivo clarificado. La solución que contiene la proteína que se va a purificar es, por ejemplo, un medio de cultivo obtenido en un biorreactor de perfusión o biorreactor semidiscontinuo.

Los ejemplos de biorreactores de perfusión o biorreactores semidiscontinuos se divulgan en la solicitud de EE. UU. US 2014/025994.

15 La expresión «medio de cultivo clarificado» se refiere a un medio de cultivo líquido obtenido a partir de un cultivo de células de mamífero, bacterianas o de levaduras que está sustancialmente exento (por ejemplo, exento en al menos un 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% o 99%) de células de mamífero, bacterias o levaduras.

20 La frase «recuperar la proteína», tal como se utiliza en la presente, se refiere a recoger una proteína después de utilizar el método de purificación divulgado. El método de purificación divulgado se puede lograr utilizando varias técnicas cromatográficas con proteínas habituales tales como, sin carácter limitante, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel y cromatografía con una resina multimodal.

25 En ciertas divulgaciones del método divulgado, la primera matriz cromatográfica es una matriz con proteína A. En divulgaciones particulares del método divulgado, la primera matriz cromatográfica es una columna con proteína A. En otras divulgaciones particulares del método divulgado, la primera matriz cromatográfica es adsorbente de membrana con proteína A. La matriz con proteína A, en particular la columna con proteína A o el adsorbente de membrana con proteína A, funciona por la afinidad entre el ligando de la resina y la proteína, lo que da como resultado una eficacia elevada de la eliminación de impurezas. Otra ventaja de utilizar una matriz con proteína A, en particular de utilizar una columna con proteína A o un adsorbente de membrana con proteína A, en el método
30 divulgado es que los mAb tienen afinidad universal respecto a la proteína A. En una realización del método divulgado, la columna con proteína A es la resina MabSelect Sure (GE Healthcare). En otra realización del método divulgado, la columna con proteína A es Absolute High Cap (Novasep). En una divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana con proteína A es un adsorbente de membrana con proteína A Sartobind (Sartorius).

35 En divulgaciones adicionales del método divulgado, la segunda matriz cromatográfica es una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal (de modo mixto). En realizaciones particulares del método divulgado, la segunda matriz cromatográfica es una columna cromatográfica con una resina multimodal (de modo mixto). La resina multimodal interacciona con la proteína de interés mediante varios mecanismos con interacciones iónicas, hidrófobas y por enlaces de hidrógeno con mAb. Más específicamente, en una columna cromatográfica con una resina multimodal, la interacción iónica con mAb es una interacción catiónica con mAb, a diferencia de las
40 interacciones aniónicas con mAb que se producen en una columna cromatográfica de intercambio aniónico (AEX) clásica.

45 En una realización específica del método divulgado, la resina multimodal es una resina Capto MMC (GE Healthcare). Capto MMC es un intercambiador catiónico multimodal con una matriz de base de agarosa sumamente reticulada. Las características de Capto MMC se resumen a continuación (remítase a GE Healthcare Life Sciences, archivo de datos 11-0035-45 AA).

Matriz	agarosa sumamente reticulada
Grupo funcional	intercambiador catiónico débil multimodal
Capacidad iónica total	0.07-0.09 mmol H ⁺ /mL de medio
Tamaño de partícula	75 μ m (d50v)

ES 2 665 645 T3

Velocidad del flujo	al menos 600 cm/h en una columna de 1 m de diámetro con una altura del lecho de 20 cm a 20 °C utilizando tampones del proceso con la misma viscosidad que el agua a < 3 bar (0.3 MPa).
Unión dinámica	> 45 mg BSA/mL de medio a 30 mS/cm
Estabilidad del pH	
a corto plazo	de 2 a 14
a largo plazo	de 2 a 12
Temperatura de trabajo	de +4°C a +30°C

En otras divulgaciones del método divulgado, la segunda matriz cromatográfica es un adsorbente de membrana de intercambio catiónico.

5 En otra divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana de intercambio catiónico es un adsorbente de membrana Sartobind S (Sartorius). En otra divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana de intercambio catiónico es un adsorbente de membrana NatriPur HD-C (Natrix).

10 En divulgaciones adicionales del método divulgado, la tercera matriz cromatográfica es una matriz cromatográfica de intercambio aniónico. En realizaciones particulares del método divulgado, la tercera matriz cromatográfica es una columna cromatográfica de intercambio aniónico. En otras divulgaciones del método divulgado, la tercera matriz cromatográfica es un adsorbente de membrana de intercambio aniónico. El resto orgánico con carga positiva reticulado covalentemente a un soporte polimérico inerte de la matriz de intercambio aniónico, en particular de la resina de intercambio aniónico, interacciona con la proteína de interés mediante interacciones aniónicas con mAb. En una realización del método divulgado, la columna cromatográfica de intercambio aniónico es BioPro Q75 (YMC). Las características de BioPro Q75 se resumen a continuación (remítase a la ficha técnica de YMC-BioPro Q75 y S75).

Matriz	microesferas poliméricas hidrófilas
Grupo cargado	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃
Capacidad de intercambio iónico	0.13 meq/mL de resina
Tamaño de partícula	75 µm
Velocidad lineal	3.0 cm/min (180 cm/h)
Unión dinámica	187 mg/mL de resina
Intervalo de pH	2.0-12.0

20 En otra divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana Sartobind Q (Sartorius). En otra divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana Sartobind STIC (Sartorius). En otra divulgación del método divulgado, el adsorbente de membrana de intercambio aniónico es un adsorbente de membrana HD-Q (Natrix).

En una realización, el método de acuerdo con la invención no comprende ajustar el pH del eluyente proteico crudo y/o del eluido proteico al final de la primera etapa cromatográfica y/o al final de la segunda etapa cromatográfica

25 En una divulgación particular, el eluyente proteico crudo obtenido al final de la primera etapa cromatográfica se pasa directamente por la segunda matriz cromatográfica, en particular, por la segunda columna o adsorbente de membrana cromatográficos. Más específicamente, no se lleva a cabo ningún tratamiento (tal como ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución) a continuación entre las dos etapas. En un método de este tipo, la columna

5 cromatográfica con una resina multimodal puede corresponder, por ejemplo, a una columna Capto MMC. En un método de este tipo, el adsorbente de membrana de intercambio catiónico puede corresponder, por ejemplo, a un adsorbente de membrana Sartobind S. Adicionalmente, en una divulgación particular, el eluido proteico obtenido al final de la segunda etapa cromatográfica se pasa directamente a través de la tercera matriz cromatográfica, en particular, a través de la tercera columna o adsorbente de membrana cromatográficos. Más específicamente, no se lleva a cabo ningún tratamiento (tal como ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución) a continuación entre las dos etapas. En un método de este tipo, la columna cromatográfica con una resina multimodal puede corresponder, por ejemplo, a una columna Capto MMC y/o la columna cromatográfica de intercambio aniónico puede corresponder, por ejemplo, a una columna BioPro Q75. En el Ejemplo 4 se divulga un ejemplo específico de este método. En un método de este tipo, el adsorbente de membrana de intercambio catiónico puede corresponder, por ejemplo, a un adsorbente de membrana Sartobind S y/o el adsorbente de membrana cromatográfico de intercambio aniónico puede corresponder, por ejemplo, a un adsorbente de membrana Sartobind Q. En el Ejemplo 8 se divulga un ejemplo específico de este método.

15 En un método de este tipo, los tratamientos entre etapas que requieren intervención manual y apertura del sistema de purificación (por ejemplo, dilución en un recipiente de inactivación, filtración después de la inactividad y ajuste del pH en un recipiente de combinación de la proteína A) están totalmente ausentes.

Una matriz cromatográfica utilizada en los métodos de la presente puede ser una matriz cromatográfica con una carga biológica reducida (por ejemplo, una matriz cromatográfica sometida a irradiación gamma). En el documento WO2015109146 se divulgan ejemplos de una matriz cromatográfica con una carga biológica reducida.

20 Por lo tanto, el método de la invención se puede realizar en un MCCS que comprende una primera, segunda y tercera matrices cromatográficas.

La expresión «sistema cromatográfico multicolumna» o «MCCS» se refiere a un sistema con un total de dos o más columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas interconectadas o de conmutación. Un ejemplo no limitante de un sistema cromatográfico multicolumna es un sistema cromatográfico de contracorriente periódico (PCCS, por sus siglas en inglés) que contiene un total de dos o más columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas interconectadas o de conmutación. En la presente se describen ejemplos adicionales de sistemas cromatográficos multicolumna y estos se conocen en la técnica.

30 La columna o columnas cromatográficas y/o la membrana o membranas cromatográficas presentes en un MCCS se pueden conectar o mover unas respecto a las otras mediante un mecanismo de conmutación (por ejemplo, un mecanismo de conmutación de columnas). El MCCS también puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) bombas (por ejemplo, automáticas, por ejemplo, bombas peristálticas automáticas). Los eventos de conmutación de columnas pueden verse iniciados por la detección de un nivel de la proteína que se va a purificar detectado por absorbancia UV que corresponde a un cierto nivel de la proteína en el fluido que pasa a través del MCCS (por ejemplo, la alimentación y/o el eluido de una o más de la columna o columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas en el MCCS), un volumen específico del líquido (por ejemplo, tampón) o un tiempo específico transcurrido. Por lo general, la conmutación de columnas se refiere a un mecanismo por el cual se permite que al menos dos columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas diferentes en un MCCS (por ejemplo, dos o más columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas diferentes presentes en un MCCS) pasen a través de una etapa diferente (por ejemplo, equilibración, carga, elución o lavado) a sustancialmente el mismo tiempo durante al menos parte del proceso.

La columna o columnas cromatográficas y/o la membrana o membranas cromatográficas presentes en un MCCS pueden tener uno o más de cualquiera de las formas, tamaños, volúmenes (volúmenes del lecho) y/u operación u operaciones unitarias ilustrativos descritos en la presente.

45 La columna o columnas cromatográficas y/o la membrana o membranas cromatográficas presentes en un MCCS pueden contener una o más de cualquiera de las resinas ilustrativas descritas en la presente o conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resina contenida en una o más de la columna o columnas cromatográficas y/o la membrana o membranas cromatográficas presentes en el MCCS puede ser una resina que utiliza un mecanismo de captura (por ejemplo, mecanismo de captura de unión a la proteína A, mecanismo de captura de unión a la proteína G, mecanismo de captura de unión al anticuerpo o un fragmento del anticuerpo, mecanismo de captura de unión al sustrato, mecanismo de captura de unión al cofactor, mecanismo de captura de unión a un aptámero y/o mecanismo de captura de unión a una etiqueta). La resina contenida en una o más de la columna o columnas cromatográficas y/o membrana o membranas cromatográficas del MCCS puede ser una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico, una resina de tamices moleculares o una resina de interacción hidrófoba, o cualquier combinación de estas. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de resinas que se pueden utilizar para purificar una proteína y estas pueden estar contenidas en una o más de la columna o columnas cromatográficas y/o membrana o membranas cromatográficas presentes en el MCCS. La columna o columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas presentes en el MCCS pueden contener resinas idénticas y/o diferentes (por ejemplo, cualquiera de las resinas descritas en la presente o conocidas en la técnica para su uso en la purificación de proteínas recombinantes).

La columna o columnas cromatográficas y/o resina o resinas cromatográficas presentes en el MCCS pueden realizar una o más operaciones unitarias (por ejemplo, captura de una proteína, purificación de una proteína, purificación final exhaustiva de una proteína, inactivación de virus, ajuste de la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína o filtración de un fluido que contiene una proteína). En los ejemplos no limitantes, el MCCS puede realizar las operaciones unitarias de captura de una proteína a partir de un fluido (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) e inactivación de virus presentes en el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante. El MCCS puede realizar cualesquiera combinaciones de dos o más operaciones unitarias descritas en la presente o conocidas en la técnica.

Se puede equipar un MCCS con: uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) monitores UV, una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) válvulas, uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) pH-metros y/o uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) medidores de la conductividad. Un MCCS también puede estar equipado con un sistema operativo que utiliza software (por ejemplo, un software basado en Unicorn, GE Healthcare, Piscataway, NJ) para detectar cuándo debería producirse una conmutación de la columna (por ejemplo, en función de la absorbancia UV, volumen del líquido o tiempo transcurrido) y que afecta (inicia) los eventos de conmutación de la columna. En los ejemplos en los que el MCCS incluye uno o más detectores UV, los detectores UV se pueden colocar opcionalmente en la entrada de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) de la columna o columnas cromatográficas y/o membrana o membranas cromatográficas en el MCCS, y/o a la salida de una o más de la columna o columnas cromatográficas y/o membrana o membranas cromatográficas en el MCCS.

Un MCCS puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés o veinticuatro) depósitos o depósitos de ajuste del tampón y/o depósitos del tampón en línea. En otros ejemplos, el MCCS puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) tanques de separación que pueden guardar fluido que no puede pasar con facilidad al interior de una o más de las columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas en el MCCS. Los sistemas descritos en la presente pueden contener uno o más tanques de separación. Otros ejemplos de los sistemas descritos en la presente no incluyen un tanque de separación.

Un sistema MCCS puede incluir una entrada a través de la cual se puede introducir fluido (por ejemplo, un medio de cultivo líquido que está sustancialmente exento de células) en dicho MCCS. La entrada puede ser cualquier estructura conocida en la técnica para tales objetivos. Puede incluir, por ejemplo, un roscado, nervado o sello que permita que se inserte un conducto fluido, de modo que tras la inserción del conducto fluido en la entrada, el fluido entrará en el MCCS en la entrada sin un escape significativo del fluido fuera de la entrada. Las entradas no limitantes que se pueden utilizar en los sistemas de la presente son conocidas en la técnica y serían entendidas por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos de los sistemas que se proporcionan en la presente también incluyen un biorreactor que está en conectividad fluida con la entrada del MCCS. Cualquiera de los biorreactores ilustrativos descritos en la presente o conocidos en la técnica se puede utilizar en los sistemas de la presente.

El MCCS puede incluir una salida a través de la cual la proteína puede abandonar el sistema. La salida puede incluir, por ejemplo, un roscado, nervado o sello que permita que se inserte un conducto fluido o un vial diseñado para contener o almacenar la proteína. Una salida puede contener una superficie que se puede utilizar para sellar un vial u otro envase de almacenamiento estéril en la salida con el fin de permitir que la proteína fluya directamente en el vial u envase de almacenamiento estéril. Las salidas no limitantes que se pueden utilizar en los sistemas de la presente son conocidas en la técnica y serían entendidas por los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de los sistemas que se proporcionan en la presente también incluyen un sistema de bombas. Un sistema de bombas puede incluir uno o más de los siguientes: una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) bombas (por ejemplo, cualquiera de las bombas descritas en la presente o conocidas en la técnica), uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) filtros (por ejemplo, cualquiera de los filtros descritos en la presente o conocidos en la técnica), uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) detectores UV y uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) tanques de separación.

Algunos ejemplos de los sistemas descritos en la presente incluyen además un conducto fluido adicional conectado al conducto fluido entre la bomba y la entrada del MCCS, donde se conecta de manera fluida un extremo del conducto fluido adicional con un biorreactor y el otro extremo se conecta de manera fluida con el conducto fluido entre la bomba y la entrada. Este conducto fluido adicional puede incluir un filtro que es capaz de eliminar las células del medio de cultivo líquido eliminado del biorreactor (por ejemplo, sistema de retención de células ATF). En algunos ejemplos, este conducto fluido particular puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) bombas (por ejemplo, cualquiera de las bombas descritas en la presente o conocidas en la técnica) y/o uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) tanques de separación (por ejemplo, cualquiera de los tanques de separación ilustrativos descritos en la presente), donde esta bomba o bombas y/o tanque o tanques de separación están en conexión fluida con el fluido presente en el conducto fluido.

Los sistemas descritos en la presente pueden incluir opcionalmente un conducto fluido dispuesto entre la columna cromatográfica o membrana cromatográfica finales y la salida. Los sistemas descritos en la presente pueden incluir además uno o más filtros en conexión fluida con el conducto fluido dispuesto entre la columna cromatográfica o membrana cromatográfica finales y la salida, de manera que el filtro pueda eliminar, por ejemplo, material precipitado, materia particulada o bacterias del fluido presente en el conducto fluido dispuesto entre la columna cromatográfica o membrana cromatográfica finales en el MCCS y la salida.

El método de la invención se ejecuta en modo continuo. En otras palabras, el método de la invención es un método continuo para purificar una proteína a partir de una solución.

La expresión «método continuo» o «método en un modo continuo» se refiere a un método en el cual se alimenta de manera continua fluido a través de al menos una parte del sistema.

El término «fluido» se refiere en la presente a cualquier líquido, tal como una solución que contiene la proteína que se va a purificar, un tampón o una solución con un pH bajo o ácido para la inactivación viral.

En una realización preferida, la primera, segunda y tercera matrices se alimentan continuamente con un fluido.

La expresión «proceso integrado» se refiere a un proceso que se realiza utilizando elementos estructurales que funcionan de manera cooperativa para conseguir un resultado específico (por ejemplo, la generación de una proteína purificada a partir de un medio de cultivo líquido).

Se divulgan ejemplos de procesos integrados en el documento US 2014/0255994.

El aumento a escala del método de la invención también puede incluir el uso del conmutador de columnas y/o el aumento del volumen del lecho de cada columna cromatográfica.

Además, el método de la invención se puede ejecutar en un sistema cerrado desde la primera etapa del método hasta la última. En particular, las etapas cromatográficas y la etapa o etapas de filtración opcionales (por ejemplo, la etapa de nanofiltración y/o la etapa de ultrafiltración y diafiltración) se pueden ejecutar en un sistema cerrado. En una divulgación específica del método divulgado en la presente, la solución que comprende proteínas se pasa, en partes, por las tres matrices cromatográficas, en particular por las tres columnas o adsorbentes de membranas cromatográficas, correspondiendo cada paso de una parte de la solución a una ejecución. Las proteínas recuperadas al final de cada ejecución se recogen y se combinan. En los Ejemplos 5, 6 y 8 se divulgan ejemplos específicos de este método. En un método de este tipo, la columna o adsorbente de membrana de una etapa cromatográfica se utiliza varias veces y, opcionalmente, se sana utilizando, por ejemplo, un tampón de saneamiento tal como se ha definido anteriormente, lo que permite reducir de esta manera la cantidad de resina o dispositivos de adsorbente de membrana y tampón necesarios. Por ejemplo, se puede realizar de manera continua una secuencia de 3 a 50 ejecuciones (por ejemplo, de 3 a 30 ejecuciones, de 5 a 25 ejecuciones, de 10 a 20 ejecuciones o 15 ejecuciones). Más específicamente, se pueden realizar 3, 4, 5, 6, 7 u 8 ejecuciones en modo continuo, y después el saneamiento de las 3 columnas o adsorbentes de membrana (por ejemplo, utilizando el tampón de saneamiento). Esto se podría repetir, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

El método divulgado en la presente se puede utilizar para recuperar proteínas purificadas. El término «purificado», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Para que una proteína sea útil en aplicaciones *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, debería estar sustancialmente exenta de contaminantes, otras proteínas y/o agentes químicos que pudieran interferir con el uso de esa proteína en tales aplicaciones, o de las que al menos sería algo indeseable su inclusión con la proteína de interés. Tales aplicaciones incluyen la preparación de composiciones terapéuticas, la administración de la proteína en una composición terapéutica y otros métodos divulgados en la presente. Preferentemente, una proteína «purificada», tal como se menciona en la presente, es una proteína que se puede producir mediante cualquier método (es decir, mediante purificación directa a partir de una fuente natural, de manera recombinante o sintética) y que se ha purificado de otros componentes proteicos de modo que la proteína comprenda al menos aproximadamente un 80% peso/peso de la proteína total en una composición concreta, y más preferentemente al menos aproximadamente un 85% y más preferentemente al menos aproximadamente un 90% y más preferentemente al menos aproximadamente un 91% y más preferentemente al menos aproximadamente un 92% y más preferentemente al menos aproximadamente un 93% y más preferentemente al menos aproximadamente un 94% y más preferentemente al menos aproximadamente un 95% y más preferentemente al menos aproximadamente un 96% y más preferentemente al menos aproximadamente un 97% y más preferentemente al menos aproximadamente un 98% y más preferentemente al menos aproximadamente un 99% peso/peso de la proteína total en una composición concreta.

La expresión «proteína cruda», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que se puede producir mediante cualquier método (es decir, mediante purificación directa a partir de una fuente natural, de manera recombinante o sintética) y que se ha purificado de otros componentes proteicos de manera que la proteína comprenda menos de aproximadamente un 80% peso/peso de la proteína total en una composición concreta.

En una realización particular, el método para purificar una proteína a partir de una solución de acuerdo con la invención comprende:

- 5 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna con proteína A;
 (ii) pasar la solución por la columna con proteína A;
 (iii) pasar tampón de equilibración por la columna con proteína A;
 (iv) pasar tampón de lavado por la columna con proteína A;
 (v) pasar tampón de equilibración por la columna con proteína A; y
 10 (vi) eluir un eluyente proteico crudo de la columna con proteína A utilizando un primer tampón de elución;
- (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna cromatográfica con una resina multimodal;
 (ii) pasar el eluyente proteico crudo de la etapa (a) por la columna cromatográfica con una resina multimodal;
 15 (iii) pasar tampón de equilibración por la columna cromatográfica con una resina multimodal; y
 (iv) eluir un eluido proteico de la columna cromatográfica con una resina multimodal utilizando un segundo tampón de elución;
- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna cromatográfica de intercambio aniónico;
 20 (ii) pasar el eluido proteico de la etapa (b) por la columna cromatográfica de intercambio aniónico en el modo de flujo continuo; y
 (iii) recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la columna cromatográfica de intercambio aniónico,

25 donde el tampón de equilibración comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el tampón de lavado comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 0.9 a 1.1 M ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el primer tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 con ácido acético y el segundo tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM, NaCl de 40 a 50 mM y NH₄Cl de 20 a 30 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético.

30 En otra realización, el método para purificar una proteína a partir de una solución de acuerdo con la invención comprende:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna con proteína A;
 (ii) pasar una parte de la solución por la columna con proteína A;
 35 (iii) pasar tampón de equilibración por la columna con proteína A;
 (iv) pasar tampón de lavado por la columna con proteína A;
 (v) pasar tampón de equilibración por la columna con proteína A; y
 (vi) eluir un eluyente proteico crudo de la columna con proteína A utilizando un primer tampón de elución;
- 40 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna cromatográfica con una resina multimodal;
 (ii) pasar el eluyente proteico crudo de la etapa (a) por la columna cromatográfica con una resina multimodal;
 (iii) pasar tampón de equilibración por la columna cromatográfica con una resina multimodal; y
 45 (iv) eluir un eluido proteico de la columna cromatográfica con una resina multimodal utilizando un segundo tampón de elución;
- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por una columna cromatográfica de intercambio aniónico;
 (ii) pasar el eluido proteico de la etapa (b) por la columna cromatográfica de intercambio aniónico en el modo de flujo continuo; y
 50 (iii) recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la columna cromatográfica de intercambio aniónico,
- (d) reanudar sucesivamente las etapas a), b) y c) con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y
 55 (e) recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de cada tercera etapa cromatográfica;

60 donde el tampón de equilibración comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el tampón de lavado comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 0.9 a 1.1 M ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el primer tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 con ácido acético y el segundo tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM, NaCl de 40 a 50 mM y NH₄Cl de 20 a 30 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético.

En otra divulgación, el método para purificar una proteína a partir de una solución divulgada en la presente comprende:

- 5 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana con proteína A;
 (ii) pasar la solución por el adsorbente de membrana con proteína A;
 (iii) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana con proteína A;
 (iv) pasar tampón de lavado por el adsorbente de membrana con proteína A;
 (v) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana con proteína A; y
 10 (vi) eluir un eluyente proteico crudo del adsorbente de membrana con proteína A utilizando un primer tampón de elución;
- (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana de intercambio catiónico;
 (ii) pasar el eluyente proteico crudo de la etapa (a) por el adsorbente de membrana de intercambio catiónico;
 15 (iii) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana de intercambio catiónico; y
 (iv) eluir un eluido proteico del adsorbente de membrana de intercambio catiónico utilizando un segundo tampón de elución;
- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana de intercambio aniónico;
 20 (ii) pasar el eluido proteico de la etapa (b) por el adsorbente de membrana de intercambio aniónico en el modo de flujo continuo; y
 (iii) recuperar la proteína purificada del flujo continuo del adsorbente de membrana de intercambio aniónico,

25 donde el tampón de equilibración comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el tampón de lavado comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 0.9 a 1.1 M ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el primer tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 con ácido acético y el segundo tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM, NaCl de 50 a 150 mM y NH₄Cl de 20 a 30 mM, ajustado a un pH comprendido entre 6 y 7 con ácido acético.

30 En otra divulgación, el método para purificar una proteína a partir de una solución divulgada en la presente comprende:

- (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana con proteína A;
 (ii) pasar una parte de la solución por el adsorbente de membrana con proteína A;
 35 (iii) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana con proteína A;
 (iv) pasar tampón de lavado por el adsorbente de membrana con proteína A;
 (v) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana con proteína A; y
 (vi) eluir un eluyente proteico crudo del adsorbente de membrana con proteína A utilizando un primer tampón de elución;
- 40 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana de intercambio catiónico;
 (ii) pasar el eluyente proteico crudo de la etapa (a) por el adsorbente de membrana de intercambio catiónico;
 (iii) pasar tampón de equilibración por el adsorbente de membrana de intercambio catiónico; y
 45 (iv) eluir un eluido proteico del adsorbente de membrana de intercambio catiónico utilizando un segundo tampón de elución;
- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
 (i) pasar tampón de equilibración por un adsorbente de membrana de intercambio aniónico;
 (ii) pasar el eluido proteico de la etapa (b) por el adsorbente de membrana de intercambio aniónico en el modo de flujo continuo; y
 50 (iii) recuperar la proteína purificada del flujo continuo del adsorbente de membrana de intercambio aniónico,
- (d) reanudar sucesivamente las etapas a), b) y c) con otra parte de la solución hasta que se utilice toda la solución, y
 55 (e) recoger las proteínas purificadas recuperadas al final de cada tercera etapa cromatográfica;

60 donde el tampón de equilibración comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el tampón de lavado comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 0.9 a 1.1 M ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético, el primer tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 con ácido acético y el segundo tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM, NaCl de 50 a 150 mM y NH₄Cl de 20 a 30 mM, ajustado a un pH comprendido entre 6 y 7 con ácido acético.

El método para purificar una proteína a partir de la solución puede comprender al menos una etapa de filtración, tal como una etapa de nanofiltración, una etapa de ultrafiltración y/o una etapa de diafiltración. La etapa o etapas de filtración se pueden realizar antes y/o después de las etapas cromatográficas. Cuando se purifican proteínas recombinantes con objetivos farmacéuticos, las etapas cromatográficas están seguidas normalmente por las etapas de filtración. Por lo tanto, el método de la invención puede comprender además una etapa de nanofiltración después de la etapa (c). Además, se puede llevar a cabo una etapa de ultrafiltración y diafiltración después de la etapa de nanofiltración. El término «ultrafiltración» o «UF», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una técnica de filtración que utiliza una membrana semipermeable para eliminar física y selectivamente partículas y/o iones de una solución en función del tamaño de la partícula del tamaño de los poros en la membrana de UF. El término «nanofiltración», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la filtración de una solución a través de un nanofiltro que se utiliza para eliminar, por ejemplo, partículas virales. El término «diafiltración», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la técnica que utiliza membranas de ultrafiltración para eliminar o reemplazar completamente, o reducir la concentración de sales o disolventes de las soluciones.

El método de la invención también puede comprender además al menos una etapa de inactivación viral. Dicha al menos una etapa de inactivación viral se puede realizar en cada fase del método de la invención, por ejemplo, antes de la etapa (a), después de la etapa (a), después de la etapa (b), después de la etapa (c), después de la etapa de nanofiltración y/o después de la etapa de ultrafiltración y diafiltración. Una etapa de inactivación viral de este tipo puede ser normalmente una etapa de inactivación por pH bajo o ácido. La expresión «inactivación por pH bajo o ácido», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una técnica de inactivación viral que utiliza pH ácido para desnaturalizar virus, en particular virus con envoltura. Normalmente, la etapa de inactivación por pH bajo o ácido se lleva a cabo incubando las proteínas recuperadas a un pH de entre aproximadamente 3.0 y 5.0 (por ejemplo, entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 4.5, entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 4.25, entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 4.0, por ejemplo, 4.0) durante un periodo de al menos 30 minutos (por ejemplo, un periodo de entre 1 hora y 21 días, un periodo de entre aproximadamente 2 horas y 21 días o un periodo de entre aproximadamente 4 horas y 21 días). Por ejemplo, la etapa de inactivación por pH bajo o ácido se lleva a cabo incubando las proteínas recuperadas a un pH de 4 durante, por ejemplo, de 6 h a 21 días.

El método de la invención también puede comprender antes de la etapa (a), una etapa en la que se proporciona un medio de cultivo líquido que contiene la proteína que se va a purificar que está sustancialmente exento de células, donde con dicho medio de cultivo líquido se alimenta la primera matriz cromatográfica.

Por ejemplo, el método divulgado en la presente para purificar una proteína a partir de una solución puede comprender:

(pre-a) una etapa para proporcionar un medio de cultivo líquido que contiene la proteína que se va a purificar que está sustancialmente exento de células,

(a) una primera etapa cromatográfica que comprende:

- pasar dicho medio de cultivo líquido de la etapa (pre-a) por una primera matriz cromatográfica;
- eluir un eluyente proteico crudo de la primera matriz cromatográfica utilizando un primer tampón de elución;

(b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:

- pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda matriz cromatográfica;
- eluir un eluido proteico de la segunda matriz cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución; y

(c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:

- pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera matriz cromatográfica en el modo de flujo continuo;
- recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera matriz cromatográfica;

donde cada uno de los tampones comprende Bis Tris.

Finalmente, la proteína purificada se puede formular en una composición adecuada para el almacenamiento, y/o en una composición farmacéutica adecuada para la administración a animales y/o seres humanos.

Una de las numerosas ventajas del método divulgado es que permite obtener buenos rendimientos de la proteína sumamente pura. La proteína purificada que se recupera con el método de la invención puede, por ejemplo, mostrar una pureza de al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.2%, 99.5% o un 99.9%. Más especialmente, una de las numerosas ventajas del método divulgado es que permite obtener soluciones de una proteína sumamente pura que contiene cantidades reducidas de ADN contaminante, de especies de peso molecular elevado (HMW) (que corresponden a agregados proteicos) y/o de proteínas de la célula hospedadora (HCP). La solución que comprende la proteína purificada que se recupera con el método de la invención puede, por ejemplo, mostrar una cantidad de ADN contaminante inferior a 0.4 ppb, inferior a 0.3 ppb, inferior a 0.2 ppb o inferior a 0.1 ppb. La solución que comprende la proteína purificada que se recupera con el método de la invención puede también, por ejemplo, mostrar una concentración de especies con HMW inferior a un 0.9%, inferior a un 0.8%, inferior a un 0.7%, inferior a un 0.6%, inferior a un 0.5% o inferior a un 0.4%. La solución que comprende la proteína purificada que se recupera

con el método de la invención puede también, por ejemplo, mostrar una concentración de HCP inferior a 23 ppm, inferior a 22 ppm, inferior a 21 ppm, inferior a 20 ppm, inferior a 19 ppm o inferior a 18 ppm. Además, el método de la invención puede permitir recuperar la proteína purificada con un rendimiento de al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%.

- 5 La divulgación también divulga un método para preparar tampones adecuados para su uso en el método de la invención. Ciertamente, todos estos tampones se pueden preparar muy fácil y rápidamente a partir de una única solución madre.

Un método de este tipo para preparar tampones puede comprender o estar constituido por las etapas de:

- 10 i) crear una solución (por ejemplo, una solución de 100 L) con una concentración final de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) de Bis Tris y de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) de NaCl;
- ii) ajustar el pH de la solución a un valor comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.4) con ácido acético;
- iii) recoger un cuarto de la solución, para obtener de esta manera un tampón de equilibración;
- 15 iv) ajustar el pH de un cuarto de los tres cuartos restantes de solución de la etapa (iii) a un valor comprendido entre 3 y 4 (por ejemplo, 3.7) con ácido acético, para obtener de esta manera un tampón de elución;
- v) recoger un cuarto de los dos cuartos restantes de la solución de la etapa (iii), añadir NaCl para obtener una concentración final de NaCl comprendida entre 40 y 50 mM (por ejemplo, 45 mM), añadir además NH₄Cl para obtener una concentración final de NH₄Cl comprendida entre 20 y 30 mM (por ejemplo, 25 mM) y ajustar el pH a un valor comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.25) con ácido acético, para obtener de esta manera un tampón de elución adicional;
- 20 vi) añadir NaCl al cuarto restante de la solución de la etapa (iii) y añadir NaCl para obtener una concentración final de NaCl comprendida entre 0.9 y 1.1 M (por ejemplo, 1 M), para obtener de esta manera un tampón de lavado.

Un método de este tipo se representa esquemáticamente en la Figura 1.

Otro método para preparar tampones puede comprender o estar constituido por las etapas de:

- 25 i) crear una solución (por ejemplo, una solución de 100 L) con una concentración final de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) de Bis Tris y de 15 a 25 mM (por ejemplo, 20 mM) de NaCl;
- ii) ajustar el pH de la solución a un valor comprendido entre 7 y 8 (por ejemplo, 7.4) con ácido acético;
- iii) recoger un cuarto de la solución, para obtener de esta manera un tampón de equilibración;
- 30 iv) ajustar el pH de un cuarto de los tres cuartos restantes de solución de la etapa (iii) a un valor comprendido entre 3 y 4 (por ejemplo, 3.7) con ácido acético, para obtener de esta manera un tampón de elución;
- v) recoger un cuarto de los dos cuartos restantes de la solución de la etapa (iii), añadir NaCl para obtener una concentración final de NaCl comprendida entre 70 y 90 mM (por ejemplo, 80 mM), añadir además NH₄Cl para obtener una concentración final de NH₄Cl comprendida entre 20 y 30 mM (por ejemplo, 25 mM) y ajustar el pH a un valor comprendido entre 6 y 7 (por ejemplo, 6.2) con ácido acético, para obtener de esta manera un tampón de elución adicional;
- 35 vi) añadir NaCl al cuarto restante de la solución de la etapa (iii) y añadir NaCl para obtener una concentración final de NaCl comprendida entre 0.9 y 1.1 M (por ejemplo, 1 M), para obtener de esta manera un tampón de lavado.

- 40 El método anterior para preparar tampones también puede corresponder a la primera etapa del método de la invención, antes de realizar las tres etapas cromatográficas.

La divulgación divulga además un kit que comprende o está constituido por:

- 45 (a) una matriz cromatográfica de intercambio catiónico o con una resina multimodal, una matriz cromatográfica de afinidad tal como una matriz con proteína A y/o una matriz cromatográfica de intercambio aniónico; y
- (b) al menos un tampón de acuerdo con la invención (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl) y/o instrucciones para preparar al menos un tampón de acuerdo con la invención (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl).

En una divulgación, el kit comprende o está constituido por:

- 50 (a) una columna cromatográfica con una resina multimodal, una columna cromatográfica de afinidad tal como una columna con proteína A y/o una columna cromatográfica de intercambio aniónico; y
- (b) al menos un tampón tal como se divulga en la presente (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl) y/o instrucciones para preparar al menos un tampón tal como se divulga en la presente (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl).

- 55 En otra divulgación, el kit comprende o está constituido por:

- (a) un adsorbente de membrana de intercambio catiónico, un adsorbente de membrana cromatográfico de afinidad tal como un adsorbente de membrana con proteína A, y/o un adsorbente de membrana cromatográfico de intercambio aniónico; y
- (b) al menos un tampón tal como se divulga en la presente (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl) y/o instrucciones para preparar al menos un tampón tal como se divulga en la presente (por ejemplo, que comprende o está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl).

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos ilustran las realizaciones específicas del método divulgado y varios usos de este. Se exponen únicamente a efectos explicativos y no se debe considerar que limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Optimización de los tampones de purificación

Los tampones con Bis Tris se pueden utilizar convenientemente como tampones con una columna cromatográfica con una resina multimodal.

El eluyente proteico crudo obtenido después del paso a través de una columna cromatográfica con proteína A se pasa a través de una columna cromatográfica con una resina multimodal Capto MMC.

Esta resina es capaz de fijar mAb incluso a un pH bajo, como los obtenidos después de una etapa cromatográfica en una columna con Proteína A. Sin embargo, esta resina también necesita una sal para obtener una buena elución. No obstante, una concentración demasiado elevada de sal es perjudicial para la estabilidad de mAb, ya que aumenta el nivel de especies con un peso molecular elevado (HMW) en las muestras eluidas y es demasiado eficiente con las impurezas fijadas en el medio, lo que conlleva una menor pureza de mAb.

Para evitar estos inconvenientes, los inventores generaron un diseño experimental (DOE, por sus siglas en inglés) con el fin de reducir la concentración salina y el pH en el tampón de elución de la etapa (a).

Con este objetivo, los inventores introdujeron un nuevo tipo de sal, cloruro de amonio, que aporta la misma conductividad que NaCl pero es más fuerte en lo que se refiere a las interacciones que Na⁺.

Parámetros de DOE

Se aplicó un diseño compuesto central en cara (CCF) para optimizar las condiciones de elución con software MODDE 9 (UMETRICS). El diseño CCF estuvo compuesto por un diseño factorial completo y tres puntos centrales (en la totalidad de los 17 experimentos). Se hizo variar el pH de elución entre 7.2 y 7.8 y, de la misma manera, se hizo variar la concentración de NaCl de 0 a 100 mM y se hizo variar la concentración de NH₄Cl de 0 a 50 mM.

Los factores y respuestas se resumen a continuación.

Factores								
Nombre	Unidades	Tipo	Uso	Configuración	Transf.	Prec.	Escala MLR	Escala PLS
pH	upH	Cuant.	Control.	de 7.2 a 7.8	Ninguna	Libre	Ortog.	Var. unitaria
Na	mM	Cuant.	Control.	de 0 a 100	Ninguna	Libre	Ortog.	Var. unitaria
NH ₄	mM	Cuant.	Control.	de 0 a 50	Ninguna	Libre	Ortog.	Var. unitaria
Respuestas								
Nombre	Unidades	Transf.	Escala MLR	Escala PLS	Tipo	Mín	Objetivo	Máx
Rendimiento	%	Ninguna	Ninguna	Var. unitaria	Regular	0	95	100
HCP	ppm	Ninguna	Ninguna	Var. unitaria	Regular	0	50	80
HMW	%	Ninguna	Ninguna	Var. unitaria	Regular	0	0.7	1

Abreviaturas:

Cuant.: cuantitativo, Control.: controlado; Transf.: transformación; Prec.: precisión; MLR: siglas en inglés de regresión lineal múltiple; Ortog.: ortogonal; PLS: siglas en inglés de mínimos cuadrados parciales; Var. Unitaria: varianza unitaria; HCP: proteína de la célula hospedadora; HMW: especies con un peso molecular elevado

5 Experimentos DOE

Los 17 experimentos se resumen en la siguiente tabla.

		Condiciones			Preparación (250 mL)		
N.º exp	Nombre del exp	pH	Na (mM)	NH ₄ (mM)	pH	NaCl (mg)	MH ₄ Cl (mg)
1	N1	7.2	0	0	7.2	0	0
2	N2	7.8	0	0	7.8	0	0
3	N3	7.2	100	0	7.2	1.461	0
4	N4	7.8	100	0	7.8	1.461	0
5	N5	7.2	0	50	7.2	0	0.67
6	N6	7.8	0	50	7.8	0	0.67
7	N7	7.2	100	50	7.2	1.461	0.67
8	N8	7.8	100	50	7.8	1.461	0.67
9	N9	7.2	50	25	7.2	0.73	0.334
10	N10	7.8	50	25	7.8	0.73	0.334
11	N11	7.5	0	25	7.5	0	0.334
12	N12	7.5	100	25	7.5	1.761	0.334
13	N13	7.5	50	0	7.5	0.73	0
14	N14	7.5	50	50	7.5	0.73	0.67
15	N15	7.5	50	25	7.5	0.73	0.334
16	N16	7.5	50	25	7.5	0.73	0.334
17	N17	7.5	50	25	7.5	0.73	0.334

Resultados de DOE

10 Durante las ejecuciones pareció que los cuatros experimentos fueron desiguales en lo que se refiere a recuperación de los productos. Las ejecuciones N1 y N2 no tuvieron elución debido a las condiciones y durante las ejecuciones N5 y N11 se tuvo que parar la elución después de 10 volúmenes de columna (CV, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, se excluyeron estos experimentos del análisis.

Se sometieron todos los experimentos para un análisis por SEC-HPLC y de HCP.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

ES 2 665 645 T3

N.º exp	Nombre del exp	Orden de ejecución	Incl/Excl	pH	Na	NH ₄	Rendimiento	HCP	HMW
1	N1	17	Excl	7.2	0	0	0	0	0
2	N2	9	Excl	7.8	0	0	0	0	0
3	N3	4	Incl	7.2	100	0	99.8	25	1.5
4	N4	3	Incl	7.8	100	0	94.9	42	1.84
5	N5	14	Excl	7.2	0	50	14.6	98	0.19
6	N6	6	Incl	7.8	0	50	92.2	73	0.52
7	N7	8	Incl	7.2	100	50	99.1	34	1.94
8	N8	16	Incl	7.8	100	50	98.5	45	1.96
9	N9	5	Incl	7.2	50	25	95.6	25	0.76
10	N10	15	Incl	7.8	50	25	96.7	68	1.65
11	N11	1	Excl	7.5	0	25	0.5	4370	0
12	N12	2	Incl	7.5	100	25	99.4	35	1.98
13	N13	13	Incl	7.5	50	0	87.4	38	0.43
14	N14	7	Incl	7.5	50	50	97.5	39	1.72
15	N15	11	Incl	7.5	50	25	97.2	39	1.22
16	N16	12	Incl	7.5	50	25	98.6	39	1.21
17	N17	10	Incl	7.5	50	25	95.8	42	1.21

Con la herramienta predictiva MODDE 9.0, los inventores determinaron el punto óptimo, que se refiere al espacio que contiene las condiciones a aplicar, fijando las siguientes respuestas:

- 5
- rendimiento de un 95 a un 100%
 - HCP: de 20 a 30 ppm
 - HMW: de un 0.4 a un 0.8%

Los puntos óptimos están representados en la Figura 2 para tres tipos de concentración de NH₄Cl (0, 25 y 50 mM).

10 El espacio negro es el espacio en el que se cumple el primer criterio: un rendimiento entre un 90 y un 100%. El espacio gris claro es el espacio que contiene tanto el rendimiento como la tasa de HCP (de 20 a 30 ppm). El espacio gris oscuro es el punto óptimo que es el espacio en el que se cumplen los 3 criterios: rendimiento, tasa de HCP y tasa de HMW (de un 0.4 a un 0.8%).

15 Por lo tanto, con esta descripción gráfica los inventores demostraron que cuanto más NaCl se utilizó más aumentaron HMW y el rendimiento. Además, cuanto más se aumentó el pH más importante fue la tasa de HCP. En consecuencia, los inventores demostraron que para obtener un rendimiento elevado, con una buena pureza, la elución se ha de realizar a un pH bajo con una concentración baja de NaCl.

Los inventores demostraron que se podía utilizar NH₄Cl para reducir la concentración de NaCl. La concentración de NH₄Cl más apropiada fue 25 mM, que dio lugar a un punto óptimo con más de un 95% de rendimiento, una tasa de HCP de aproximadamente 30 ppm y una tasa de HMW de un 0.6%.

Por lo tanto, los inventores demostraron que el tampón de elución óptimo para la segunda etapa cromatográfica fue Bis Tris 20 mM, NaCl 45 mM, NH₄Cl 25 mM, ácido acético q.s. hasta pH 7.25.

Ejemplo 2: Optimización de la tercera etapa cromatográfica

5 Se diseñó inicialmente un proceso de purificación, en el cual se utilizó la membrana Sartobind STIC como tercera etapa, debido a su capacidad para tolerar sales, con el fin de realizar una purificación final exhaustiva con las impurezas después de las dos primeras etapas cromatográficas y para eliminar virus.

10 Sin embargo, en un proceso continuo, cada etapa se lleva a cabo varias veces. Las membranas desechables, tales como las membranas Sartobind STIC, no se pueden reutilizar. Por lo tanto, los inventores diseñaron una tercera etapa cromatográfica alternativa que permite la purificación final exhaustiva de las impurezas, la eliminación de virus y que es reutilizable y, así pues, se puede utilizar en un proceso continuo.

Se estudiaron tres tipos de medio como etapa de purificación final exhaustiva:

- Sartobind STIC (Sartorius)
- Sartobind Q (Sartorius), y
- BioPro Q75 (YMC), una resina AEX.

15 En primer lugar, los inventores estudiaron estas resinas después de la elución de Capto MMC (NaCl 100 mM, Bis Tris 20 mM pH 8.0) con el fin de evaluar la capacidad de la tercera etapa para eliminar impurezas incluso con condiciones con NaCl 100 mM. Se evaluaron las membranas Sartobind STIC y Q en una única ejecución. La BioPro Q75 se evaluó en tres ejecuciones: concentración de NaCl 100 mM, 50 mM y 25 mM. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

	Sartobind STIC	Sartobind Q	BioPro Q75
Condiciones (NaCl, mM)	100	100	100/50/25
Tamaño (mL)	0.08	0.08	2.5
HMW (%)	1.6	1.8	1.8/1.7/1.7
HCP (ppm)	9	6	20/15/14
ADN (ppb)	2.8	0.01	0.1

20 Por lo tanto, estos resultados muestran que la membrana Sartobind STIC, debido a su capacidad para tolerar sales, proporciona una buena eliminación de impurezas. Sin embargo, un aumento de la presión durante la ejecución de 1 a 3 bar muestra que no es posible utilizar tales membranas en una tecnología reutilizable, especialmente porque la presión no disminuyó después de un lavado con NaCl 1 M y después de un saneamiento con NaOH 0.1 N. Los mejores resultados, en lo que se refiere a las impurezas, se obtuvieron con la membrana Sartobind Q. Sin embargo, debido a problemas con la disponibilidad y la capacidad de reutilización, los inventores no consideraron esta membrana adecuada.

30 Finalmente, la resina BioPro Q75 proporcionó resultados intermedios en lo que se refiere a la eliminación de impurezas. Además, no se observó presión durante las ejecuciones. Finalmente, se logró la capacidad de reutilización con tecnología clásica de resinas.

Por lo tanto, los inventores demostraron que una columna cromatográfica de intercambio aniónico era una buena alternativa a la membrana en las etapas de la purificación final exhaustiva, con el fin de llevar a cabo la purificación de proteínas mediante un proceso continuo.

Ejemplo 3: Formulación de los tampones de purificación

35 El método de purificación de tres etapas descrito en la presente utiliza cuatro tampones: un tampón de equilibración, un tampón de lavado y dos tampones de elución, todos preparados a partir de la misma solución madre. En la Figura 1 se muestra una representación esquemática del protocolo y este es de la siguiente manera: se añadió Bis Tris 20 mM eq. y NaCl 20 mM eq. a 100 L de agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) como la solución madre y el pH de la solución se ajustó a continuación a 7.4 utilizando ácido acético. A continuación, se recogieron 25 L de la solución resultante y se almacenaron como el tampón de equilibración. A continuación, se separaron 25 L de la solución madre y se añadió NaCl 1 M eq. Esta solución resultante de 25 L fue el tampón de lavado. A continuación, se ajustó el pH de 25 L de la solución madre a 3.7 con ácido acético. Esta solución resultante de 25 L fue el primer

tampón de elución. A continuación, se ajustó el pH de los 25 L restantes de la solución madre a 7.25 utilizando ácido acético y se añadió NaCl 45 mM eq. y NH₄Cl 25 mM eq., lo que dio como resultado el otro tampón de elución.

Ejemplo 4: Proceso multietapa continuo a pequeña escala

5 Se utilizó el método de la invención para una purificación de un lote pequeño de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la glucoproteína transmembrana CD38 (mAb anti-CD38).

Materiales y métodos

Material

- Primera etapa: 60 mL de resina Absolute High Cap en una columna XK50/20 personalizada con tubos Fast Flow
- 10 - Segunda etapa: 100 mL de la resina Cpto MMC en una columna XK50/20 personalizada con tubos Fast Flow
- Tercera etapa: 50 mL de la resina BioPro Q75 en una columna XK50/20 personalizada con tubos Fast Flow
- tubos Akta Purifier modificados con tubos de PEEK d.i. 1.0 mm

Detalles de la primera etapa

15 La columna XK50/20 se empaquetó con una resina Absolute High Cap (Ref. AbSHC 35 P1-A-V-00200). El volumen final fue de 60 mL. HETP fue 13538 N/m y la asimetría fue 1.2.

Para esta etapa se utilizaron tres tipos de tampón:

- Tampón de equilibración compuesto por Bis Tris 20 mM, NaCl 2 mM, ácido acético q.s. hasta pH 7.4
- 20 - Tampón de lavado compuesto por Bis Tris 20 mM, NaCl 1 M, ácido acético q.s. hasta pH 7.4
- Tampón de elución compuesto por Bis Tris 20 mM, NaCl 20 mM, ácido acético q.s. hasta pH 3.7.

El caudal, de acuerdo con el tamaño de la columna, se fijó en 24 mL/min (t_R 2.5 min) para la etapa de equilibración, lavado, carga y elución.

Detalles de la segunda etapa

25 La columna XK50/20 se empaquetó con resina Cpto MMC (Ref 17-5317-02). El volumen final fue de 100 mL. HETP fue 5686 N/m y la asimetría fue 1.3.

Se utilizaron dos tipos de tampón para esta etapa:

- Tampón de equilibración compuesto por Bis Tris 40 mM, NaCl 20 mM, ácido acético q.s. hasta pH 7.4.
- 30 - Tampón de elución compuesto por Bis Tris 20 mM, NaCl 45 mM, NH₄Cl 25 mM, ácido acético q.s. hasta pH 7.25.

El caudal, de acuerdo con el tamaño de la columna, se fijó en 24 mL/min (t_R 4.8 min) para la etapa de equilibración, carga y elución.

Detalles de la tercera etapa

La columna XK50/20 se empaquetó con resina BioPro Q75 (Ref QAA0S75). El volumen final fue de 50 mL. HETP fue 4875 N/m y la asimetría fue 1.6.

35 Se utilizó un tipo de tampón para esta etapa:

- Tampón de equilibración compuesto por Bis Tris 40 mM, NaCl 20 mM, ácido acético q.s. hasta pH 7.4.

El caudal, de acuerdo con el tamaño de la columna, se fijó en 24 mL/min (t_R 2.1 min) para la etapa de equilibración y elución.

Resultados

40 Se cargaron 2.325 g de la fracción recolectada a granel (con una concentración de 1.71 g/L) en una resina Absolute High Cap. La duración total para purificar los 2.325 g fue de 2 h 10 min. Se recuperaron 2.125 g lo que significa que el rendimiento fue de un 91%. Técnicamente, la purificación se logró con éxito sin contrapresión incluso cuando las columnas se utilizaron en una configuración en serie.

45 La eliminación de impurezas del producto final obtenido con este proceso de 3 etapas se resume y compara con la obtenida con el proceso de 2 etapas descrito en el documento PCT/EP2012/059528, en la siguiente tabla.

	Fracción recolectada a granel	Producto final del proceso de 3 etapas	Producto final del proceso de 2 etapas
Rendimiento (%)		91	92
HMW (%)	8.7	0.4	0.9
HCP (ppm)	2.2×10^5	18	23
ADN (ppb)	3×10^6	< 0.1	0.4

Por lo tanto, los inventores demostraron que el nuevo proceso multietapa continuo fue tan eficaz como el proceso de 2 etapas descrito en el documento PCT/EP2012/059528, aplicado al mismo producto.

- 5 Se llevaron a cabo estudios a pequeña escala para evaluar la tasa de impurezas obtenida después de cada etapa. Los inventores demostraron que cada etapa fue eficaz para eliminar impurezas, tal como se resume en la siguiente tabla.

	HMW (%)	HCP (ppm)	ADN (ppb)
Fracción recolectada a granel	8.7	2.2×10^5	3×10^6
Absolute HC	1.0	1×10^3	2×10^4
Capto MMC	0.4	40	10
BioPro Q75	0.4	18	< 0.1

Por lo tanto, este ejemplo muestra que el proceso continuo diseñado por los inventores es tan eficaz como un proceso discontinuo.

10 **Ejemplo 5: Proceso multietapa continuo a escala completa**

Se aplicó el método anterior a la purificación a gran escala de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la glicoproteína transmembrana CD38 (Ab anti-CD38).

Materiales y métodos

Materiales

- 15 - Primera etapa: 50 mL de la resina Absolute High Cap con una capacidad de unión dinámica (DBC, por sus siglas en inglés) de 50 mg/mL
- Segunda etapa: 100 mL de la resina Capto MMC con una DBC de 35 mg/mL
- Tercera etapa: 50 mL de la resina BioPro Q75 con una DBC de 170 mg/mL
- 20 - Sistema de contracorriente periódica de GE (purificador Akta personalizado), que comprende las 3 columnas anteriores en línea y que permite monitorizar todas las columnas.

Métodos

Se realizó de manera continua una secuencia de 15 ejecuciones. Más específicamente, se realizaron 5 ejecuciones en modo continuo seguidas por el saneamiento de las 3 columnas, con NaOH 0.1 N, antes de comenzar una nueva secuencia.

25 Resultados

Una secuencia permitió purificar 10 g de mAb anti-CD38 en menos de 500 min.

Se cargaron 29.5 g de la fracción recolectada a granel y se recuperaron 28 g de mAb purificado. Por lo tanto, el proceso multietapa continuo de la invención permitió alcanzar un rendimiento promedio de un 95%. Estos 28 g de mAb purificado se obtuvieron en 25 h.

- 5 Además, los resultados analíticos del producto final fueron comparables con los del producto final obtenido con el proceso de 2 etapas descrito en el documento PCT/EP2012/059528. Esos resultados analíticos se resumen en la siguiente tabla.

	Fracción recolectada a granel	Proceso de 2 etapas	Proceso multietapa continuo
Rendimiento (%)		94	95
HMW (%)	8.7	0.9	0.2
HCP (ppm)	2.2×10^5	4	5
ADN (ppb)	3×10^6	1.3	< 0.1

Este fue también el caso cuando cada etapa se analizó por separado, tal como se muestra en la siguiente tabla.

	HMW (%)	HCP (ppm)	ADN (ppb)
Fracción recolectada a granel	8.7	2.2×10^5	3×10^6
Absolute HC	1.0	800	2×10^4
Capto MMC	0.2	40	10
BioPro Q75	0.2	5	< 0.1

- 10 Además, tal como se muestra en la Figura 3, los patrones no mostraron ninguna diferencia significativa entre cada ejecución.

Ejemplo 6: Purificación discontinua en modo continuo

Se utilizó el proceso descrito en el Ejemplo 5 para purificar mAb anti-CD38 en un lote continuo a escala completa.

- 15 En este ejemplo, se purificaron 43 L de mAb, con una concentración de 1.66 g/L, de manera continua durante 69 h. Más específicamente, se realizaron 45 ejecuciones, cargándose en cada ejecución 960 mL de producto clarificado. Esto condujo a recuperar 19.5 L de mAb purificado, con una concentración de 3.42 g/L, lo que representa un rendimiento de un 93%, utilizando únicamente 70 L de tampones.

La siguiente tabla resume las características de este método de purificación en comparación con las de un proceso de purificación de 2 etapas descrito en el documento PCT/EP2012/059528.

	Proceso de 2 etapas	Proceso multietapa continuo
Número de etapas	2	3
Número de ejecuciones	1+1	45
Duración (h)	72	69
Sistema utilizado	Proceso Akta	Sistema de contracorriente periódica
Volumen de los tampones (L)	99.2	69.7

	Proceso de 2 etapas	Proceso multietapa continuo
Tipo de columnas	BPG140	XK50/20
Volumen de la resina (L)	7.5	0.2

En consecuencia, el proceso multietapa continuo de la invención permite reducir el volumen de tampones utilizado en un 33% y el volumen de las resinas utilizado en un 97%.

Ejemplo 7: Purificación de diferentes anticuerpos monoclonales

- 5 Además del anticuerpo anti-CD38 humanizado, se utilizó el Proceso multietapa continuo descrito anteriormente para purificar anticuerpos adicionales, concretamente un anticuerpo totalmente humano que se une específicamente al polisacárido de la superficie bacteriana poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG), un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5) y el mAb 13C3 humanizado que se une a la forma protofibrilar de la proteína β -amiloide humana tal como se ha descrito en la Publicación Internacional N.º WO 2009/065054.

La siguiente tabla muestra el rendimiento global y la pureza obtenida tras la purificación de estos tres anticuerpos.

Anticuerpo	Rendimiento global (%) ¹	Pureza (%)
mAb 13C3 humanizado	86	96
mAb anti-PNAG	89	96
mAb anti-CD38	93	99
mAb anti-CEACAM5	92	96

¹El rendimiento global corresponde al rendimiento antes de las etapas de nanofiltración, ultrafiltración y diafiltración.

- 15 Para concluir, se ha confirmado con cuatro anticuerpos diferentes que el método del Proceso multietapa continuo permite obtener buenos rendimientos de los anticuerpos purificados con un grado excelente de pureza, teniendo los anticuerpos purificados una calidad adecuada para la administración a seres humanos.

Ejemplo 8: Proceso multietapa continuo con adsorbentes de membrana

Se aplicó el método de la invención utilizando adsorbentes de membrana desechables a la purificación a gran escala de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a CD38 (mAb anti-CD38).

20 Materiales y métodos

Materiales

- Primera etapa: 4 adsorbentes de membrana con proteína A Sartobind (Sartorius) cada uno de 2 mL
- Segunda etapa: 2 adsorbentes de membrana Sartobind S «nano» (Sartorius) cada uno de 3 mL
- Tercera etapa: 1 adsorbente de membrana Sartobind Q «nano» (Sartorius) de 3 mL

- 25 Los tampones utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 4, excepto el tampón de elución de la segunda etapa compuesto por Bis Tris 20 mM, NaCl 80 mM, NH₄Cl 25 mM, ácido acético q.s. hasta 6.2.

Métodos

El proceso se llevó a cabo para purificar 1.5 g de anticuerpos mediante 50 ejecuciones de 30 mg cada una mediante las 3 etapas anteriores en un modo continuo.

- 30 Resumiendo, se equilibró el adsorbente de membrana con la proteína A con el tampón de equilibración y después se cargó. Después de la carga, el adsorbente de membrana se equilibró de nuevo, antes de la elución con el primer tampón de elución. El eluido del adsorbente de membrana con la proteína A se cargó directamente sobre el adsorbente de membrana de intercambio catiónico. Aunque la membrana de intercambio catiónico se equilibró con

el tampón de equilibración, se saneó el adsorbente de membrana con la proteína A con el tampón de saneamiento antes de la siguiente carga. Se eluyó el adsorbente de membrana de intercambio catiónico con el segundo tampón de elución y el eluido se cargó directamente sobre el adsorbente de membrana de intercambio aniónico.

Resultados

- 5 Fue posible purificar los 1.5 g de anticuerpos en 750 min (15 min por ejecución). La recuperación fue de aproximadamente un 80%.

Los resultados analíticos se resumen en la siguiente tabla.

	Proceso multietapa continuo con membrana
HMW (%)	1.8
LMW (%)	0.6
HCP (ppm)	10
ADN (ppb)	0.9

- 10 En consecuencia, el proceso multietapa continuo de acuerdo con la invención, que utiliza adsorbentes de membrana desechables, permite obtener tasas de eliminación de impurezas satisfactorias, dentro de las especificaciones internas, sin una optimización adicional del proceso y los tampones en comparación con el proceso que utiliza resinas reutilizables.

- 15 Además, tal como se muestra en la Figura 4, los patrones no mostraron ninguna diferencia significativa entre cada ejecución. En consecuencia, los inventores demostraron sorprendentemente que los adsorbentes de membrana desechables fueron de hecho estables y se podrían reutilizar durante 50 ejecuciones sin ninguna reducción del rendimiento.

La principal ventaja de utilizar adsorbentes de membrana en lugar de columnas en el método de la invención se resume a continuación:

- 20 - a una escala comparable, los adsorbentes de membrana se pueden utilizar con un caudal 10 veces superior al de una columna, y de esta manera se reduce drásticamente la duración del proceso. Por ejemplo, una columna de 5 mL empaquetada con resina se utilizará con un caudal de 1 mL/min, mientras que el adsorbente de membrana de 5 mL correspondiente se utilizará con un caudal mínimo de 10 mL/min. En consecuencia, cuando las 3 etapas cromatográficas del proceso de la invención se realizan en 2 h 30 utilizando 3 columnas empaquetadas con resinas, esto se puede completar en 15 min utilizando adsorbentes de membrana.
- 25 - incluso si son reutilizables, los adsorbentes de membrana son dispositivos desechables, que, por lo tanto, se pueden desechar después de un lote y no es necesario almacenarlos a largo plazo. Por consiguiente, no es necesario estudiarlos para garantizar una estabilidad a largo plazo.
- 30 - el método de la invención que utiliza adsorbentes de membrana es más barato al evitar el coste de la columna, el empaquetamiento de la columna y el almacenamiento de la columna.

Ejemplo 9: Proceso multietapa continuo a escala GMP

Se aplicó el método anterior a la purificación a gran escala de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la glucoproteína transmembrana CD38 (Ab anti-CD38).

Materiales y métodos

35 *Materiales*

- Primera etapa: 6 L de resina MabSelect Sure con una capacidad de unión dinámica (DBC) de 35 mg/mL
- Segunda etapa: 6 L de resina Capto MMC con una DBC de 35 mg/mL
- Tercera etapa: 6 L de resina BioPro Q75 con una DBC de 170 mg/mL
- 40 - 2 AktaProcess de GE (para probar las 3 columnas) y un Flexact de Sartorius (para completar una etapa de inactivación a pH bajo, entre la primera etapa y la segunda etapa), que comprenden las 3 columnas anteriores en línea y que posibilitan monitorizar todas las columnas.

Métodos

Se realizó de manera continua una secuencia de 7 ejecuciones.

Resultados

Una secuencia permitió purificar 1.3 kg de mAb anti-CD38 en menos de 16 h.

5 Se cargaron 14.4 kg de la fracción recolectada a granel y se recuperaron 1.30 kg de mAb purificado. Por lo tanto, el proceso multietapa continuo de la invención permitió alcanzar un rendimiento promedio de un 90%. Estos 1.3 kg de mAb purificado se obtuvieron en 16 h.

A efectos comparativos, la purificación de un lote de 500 L con un proceso de 2 etapas lleva 3 días y utiliza columnas de 20 L.

10 Por lo tanto, la estrategia continua de acuerdo con la invención es una evolución que permite ahorrar tiempo y materias primas (ahorra más de un 66% del volumen de las resinas).

Además, los resultados analíticos del producto final fueron comparables a los del producto final obtenido con el proceso de 2 etapas descrito en el documento WO2013075849. Esos resultados analíticos se resumen en la siguiente tabla.

	Fracción recolectada a granel	Proceso actual (proceso de 2 etapas) y sin tratamiento a pH bajo	Proceso multietapa continuo
Rendimiento (%)		95	90
HMW (%)	6.5	0.9	1.3
HCP (ppm)	3×10^5	5	5
ADN (ppb)	3×10^6	<0.1	< 0.1

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína a partir de una solución que comprende:

(a) una primera etapa cromatográfica que comprende:

- 5
- pasar dicha solución por una primera columna cromatográfica, siendo dicha primera columna cromatográfica una columna cromatográfica de afinidad que es una columna con proteína A;
 - eluir un eluyente proteico crudo de la primera columna cromatográfica utilizando un primer tampón de elución;

(b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:

- 10
- pasar el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) por una segunda columna cromatográfica, siendo dicha segunda columna cromatográfica una columna cromatográfica con una resina multimodal;
 - eluir un eluido proteico de la segunda columna cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución; y

(c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:

- 15
- pasar el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) a través de una tercera columna cromatográfica en el modo de flujo continuo, siendo dicha tercera columna cromatográfica una columna cromatográfica de intercambio aniónico;
 - recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera columna cromatográfica;

20 donde cada uno de los tampones está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl, y donde dicho método se lleva a cabo en un modo continuo.

2. El método de la reivindicación 1, donde el eluyente proteico crudo obtenido al final de la etapa (a) se pasa directamente por una segunda columna cromatográfica, sin experimentar ningún tratamiento tal como ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución.

25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el eluido proteico obtenido al final de la etapa (b) se pasa directamente por una tercera columna cromatográfica, sin experimentar ningún tratamiento tal como ajuste del pH, intercambio del tampón o dilución.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el método se ejecuta en un sistema cerrado desde la primera etapa hasta la última.

30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde cada una de las dos primeras etapas cromatográficas comprende:

- 35
- pasar tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
 - pasar la solución o el eluyente proteico crudo por la columna cromatográfica;
 - pasar tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
 - opcionalmente pasar tampón de lavado por la columna cromatográfica;
 - opcionalmente pasar tampón de equilibración por la columna cromatográfica;
 - eluir el eluyente proteico crudo o el eluido proteico de la columna cromatográfica utilizando un tampón de elución;

donde cada uno de los tampones está constituido por Bis Tris, ácido acético, NaCl, agua y opcionalmente NH₄Cl.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho método comprende las etapas de:

40 (a) una primera etapa cromatográfica que comprende:

- 45
- (i) pasar tampón de equilibración por una primera columna cromatográfica, siendo dicha primera columna cromatográfica una columna cromatográfica de afinidad que es una columna con proteína A;
 - (ii) pasar la solución por la primera columna cromatográfica;
 - (iii) pasar tampón de equilibración por la primera columna cromatográfica;
 - (iv) pasar tampón de lavado por la primera columna cromatográfica;
 - (v) pasar tampón de equilibración por la primera columna cromatográfica; y
 - (vi) eluir un eluyente proteico crudo de la primera columna cromatográfica utilizando un primer tampón de elución

50 (b) una segunda etapa cromatográfica que comprende:

- 55
- (i) pasar tampón de equilibración por una segunda columna cromatográfica, siendo dicha segunda columna cromatográfica una columna cromatográfica con una resina multimodal;
 - (ii) pasar el eluyente proteico crudo de la etapa (a) por la segunda columna cromatográfica;
 - (iii) pasar tampón de equilibración por la segunda columna cromatográfica; y
 - (iv) eluir un eluido proteico de la segunda columna cromatográfica utilizando un segundo tampón de elución;

y

- (c) una tercera etapa cromatográfica que comprende:
- (i) pasar tampón de equilibración por una tercera columna cromatográfica, siendo dicha tercera columna cromatográfica una columna cromatográfica de intercambio aniónico;
 - (ii) pasar el eluido proteico de la etapa (b) por la tercera columna cromatográfica en el modo de flujo continuo;
 - (iii) opcionalmente pasar el tampón de lavado por la tercera columna cromatográfica; y
 - (iv) recuperar la proteína purificada del flujo continuo de la tercera columna cromatográfica.
- 5
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la proteína es un anticuerpo monoclonal.
- 10
8. El método de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal se selecciona a partir del grupo constituido por un anticuerpo que se une específicamente a la forma protofibrilar de la proteína β -amiloide humana, un anticuerpo que se une específicamente al polisacárido de la superficie bacteriana poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG), un anticuerpo que se une específicamente a la molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5) y un anticuerpo que se une específicamente a la glucoproteína transmembrana CD38.
- 15
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además una etapa de nanofiltración después de la etapa (c).
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además una etapa de ultrafiltración y diafiltración después de la etapa de nanofiltración.
- 20
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el primer tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 3 y 4 con ácido acético.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el segundo tampón de elución comprende Bis Tris de 15 a 25 mM, NaCl de 40 a 50 mM y NH_4Cl de 20 a 30 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético.
- 25
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, donde el tampón de equilibración comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 15 a 25 mM, ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, donde el tampón de lavado comprende Bis Tris de 15 a 25 mM y NaCl de 0.9 a 1.1 M ajustado a un pH comprendido entre 7 y 8 con ácido acético.
- 30
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la proteína purificada se recupera con un rendimiento de al menos un 95%.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la proteína purificada recuperada muestra una pureza de al menos un 99%.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende además una etapa de formulación de la proteína purificada recuperada en una composición farmacéutica.

35

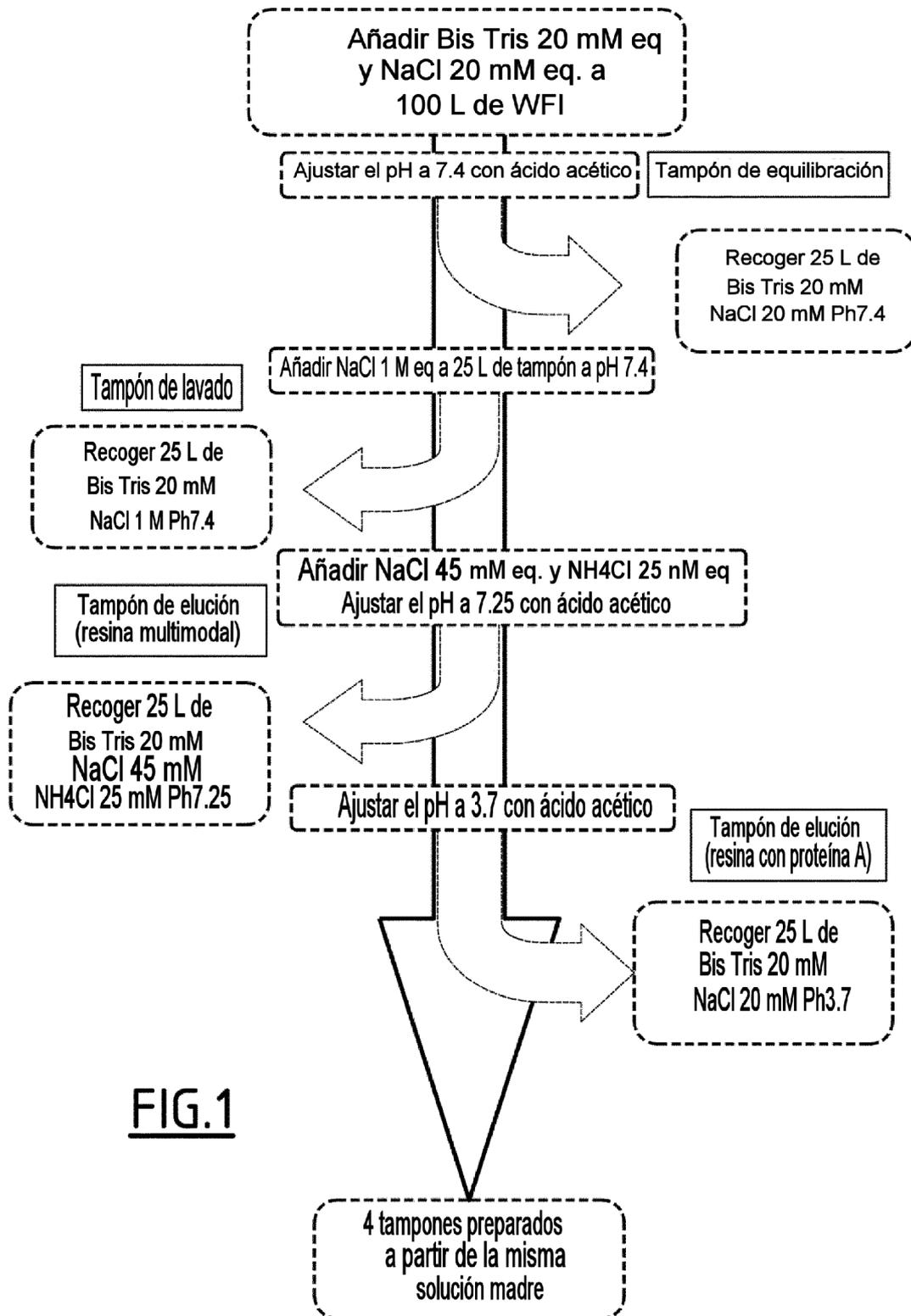


FIG.1

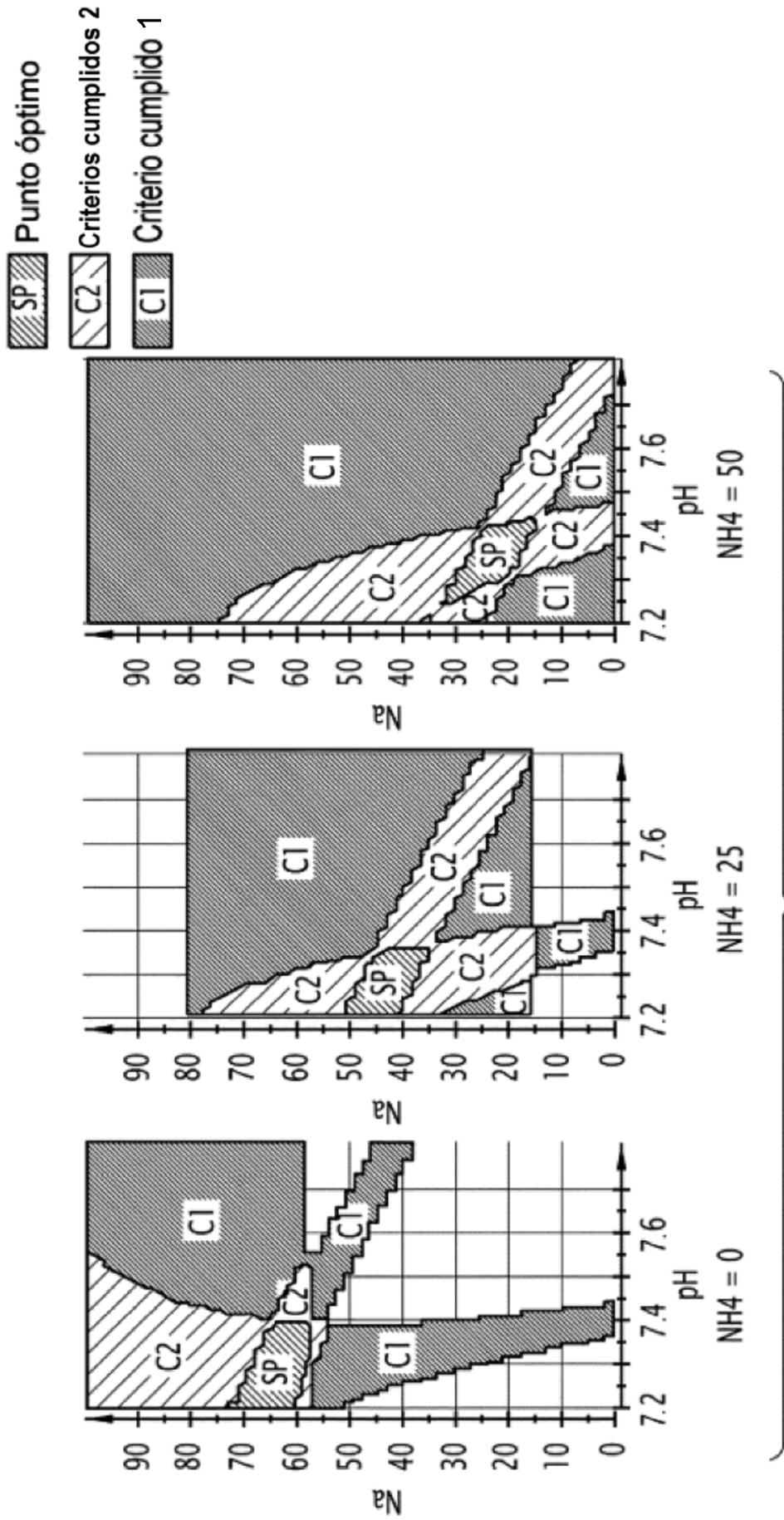
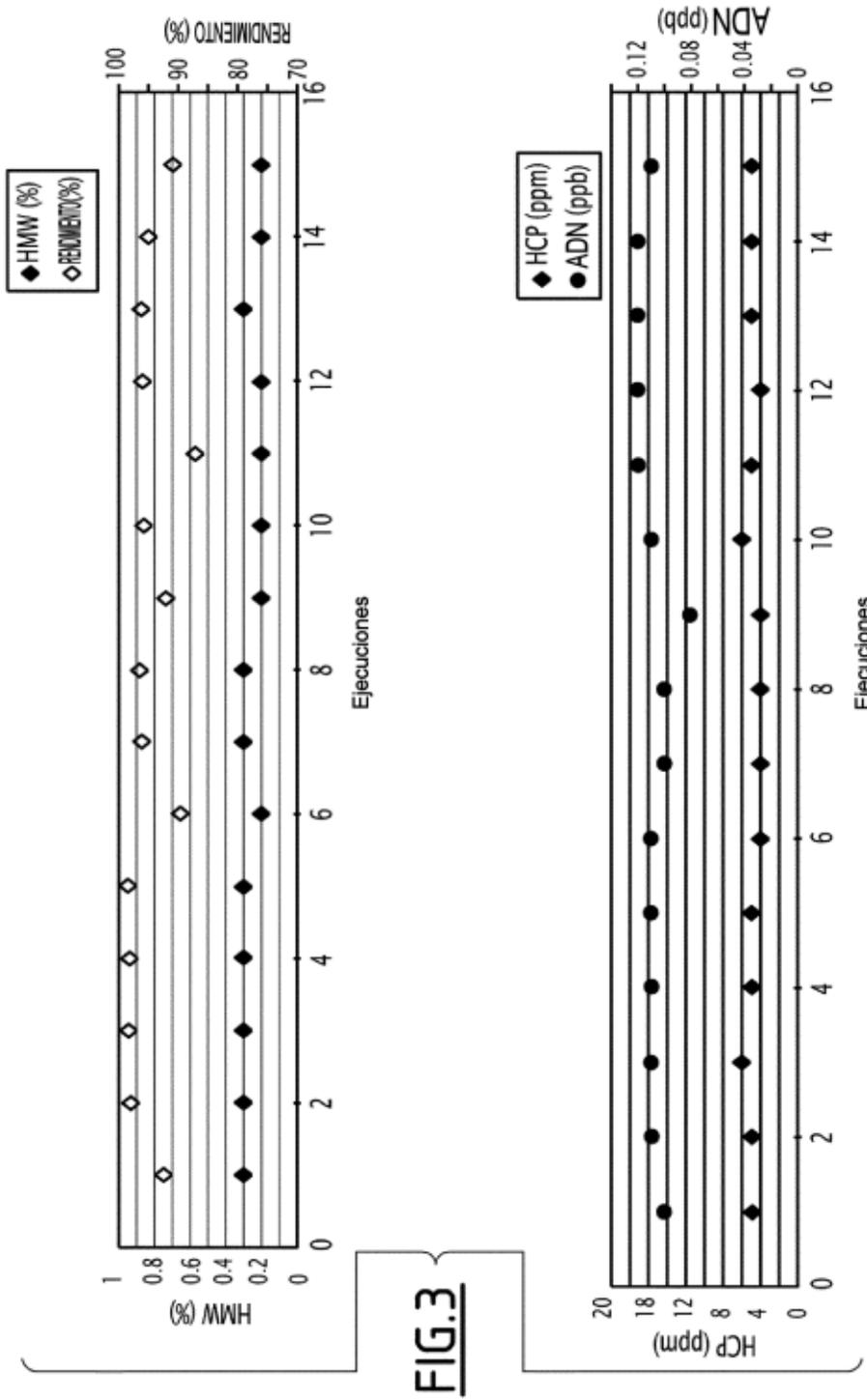


FIG.2



Análisis de las tendencias - Sartobind ProtA

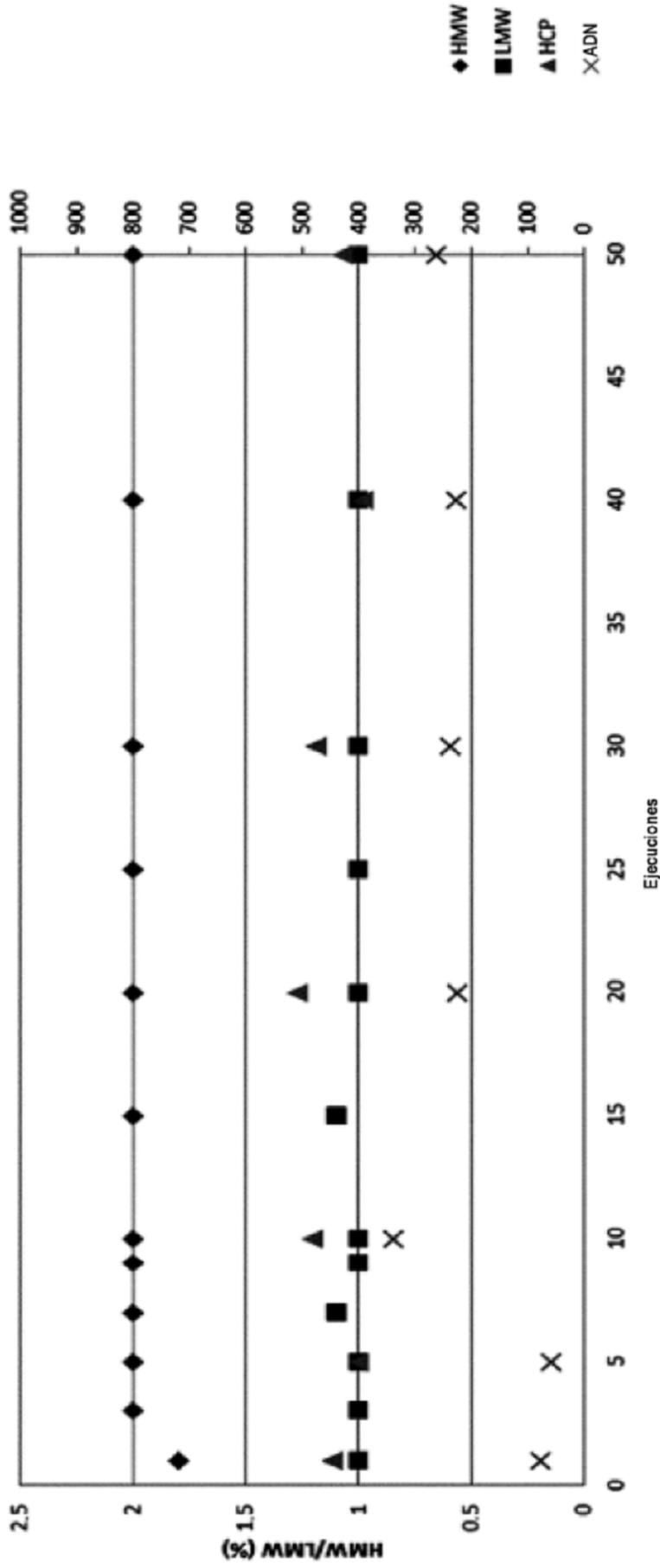


FIG.4

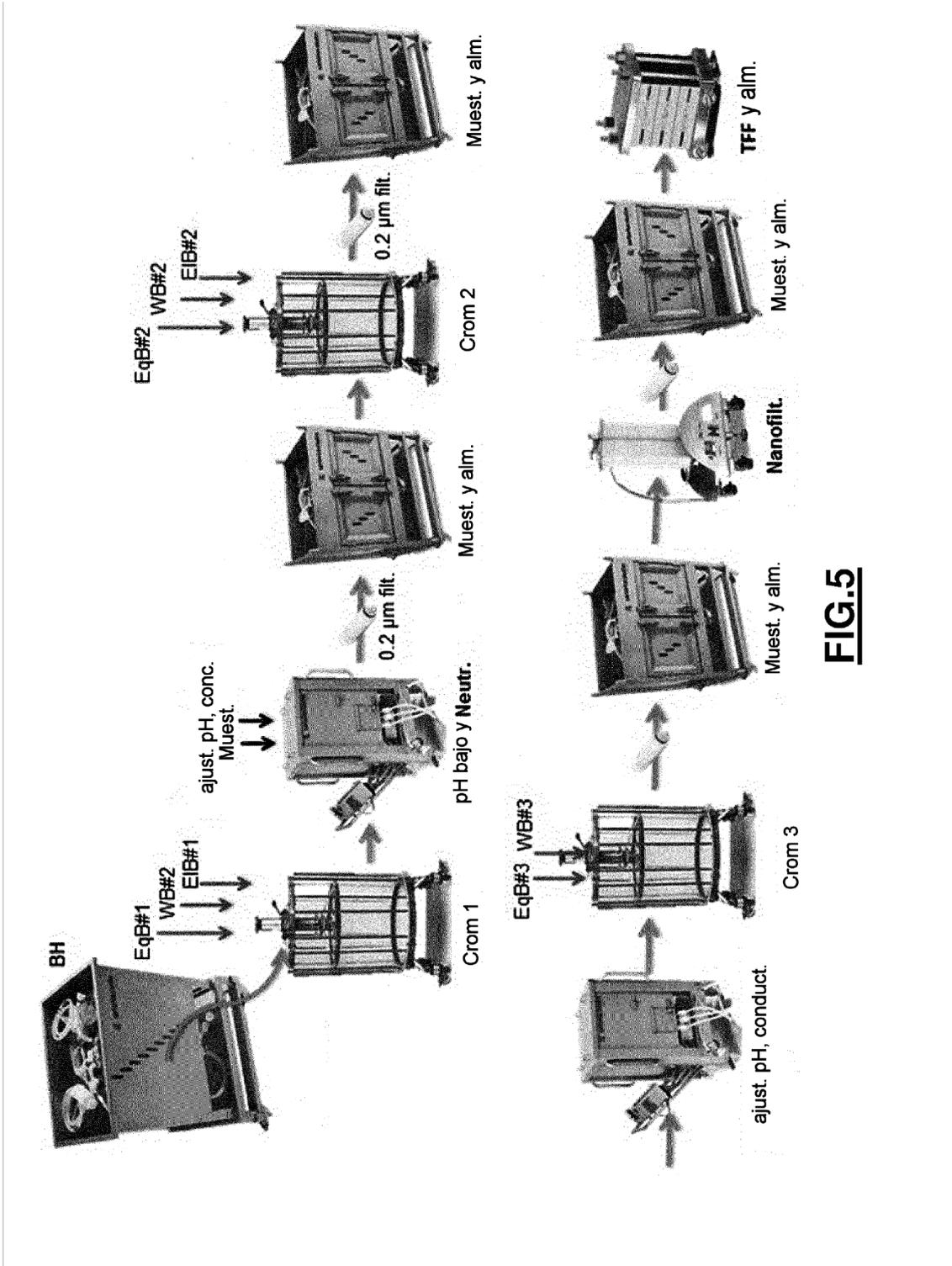


FIG.5

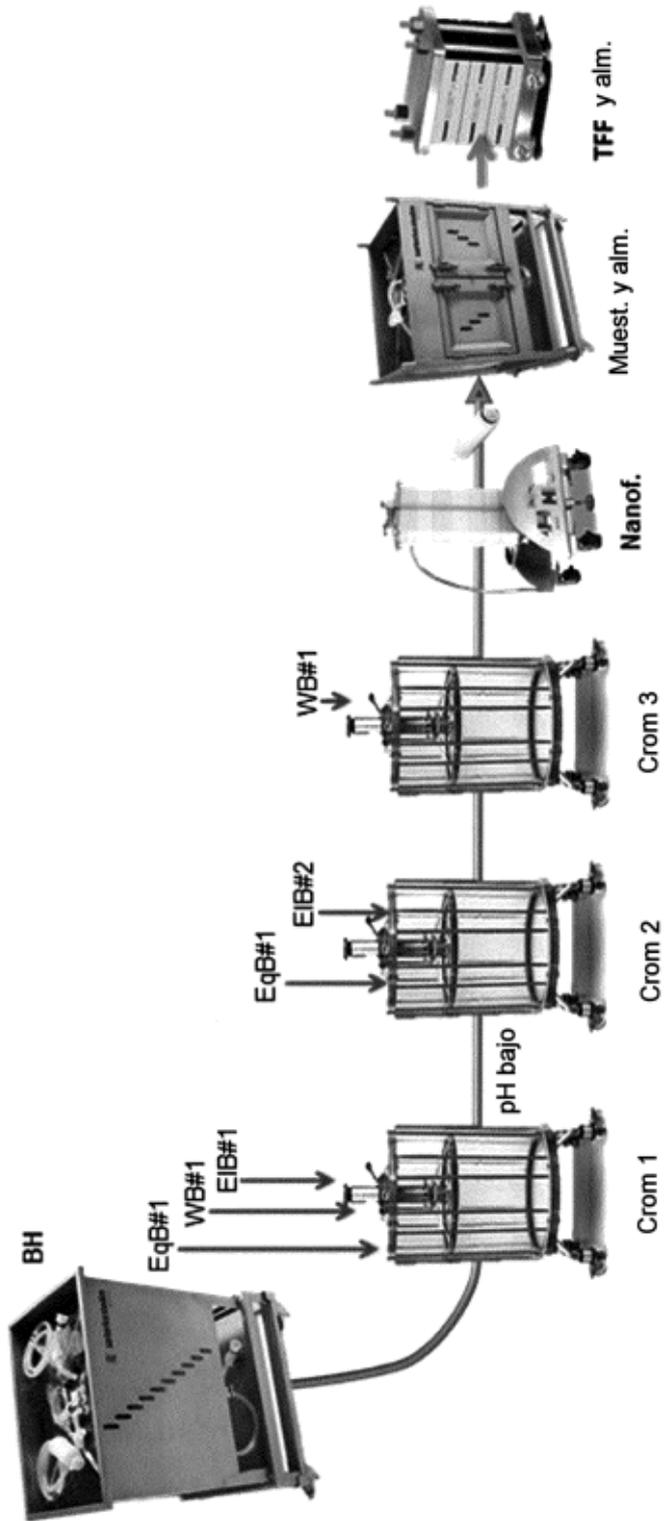


FIG.6

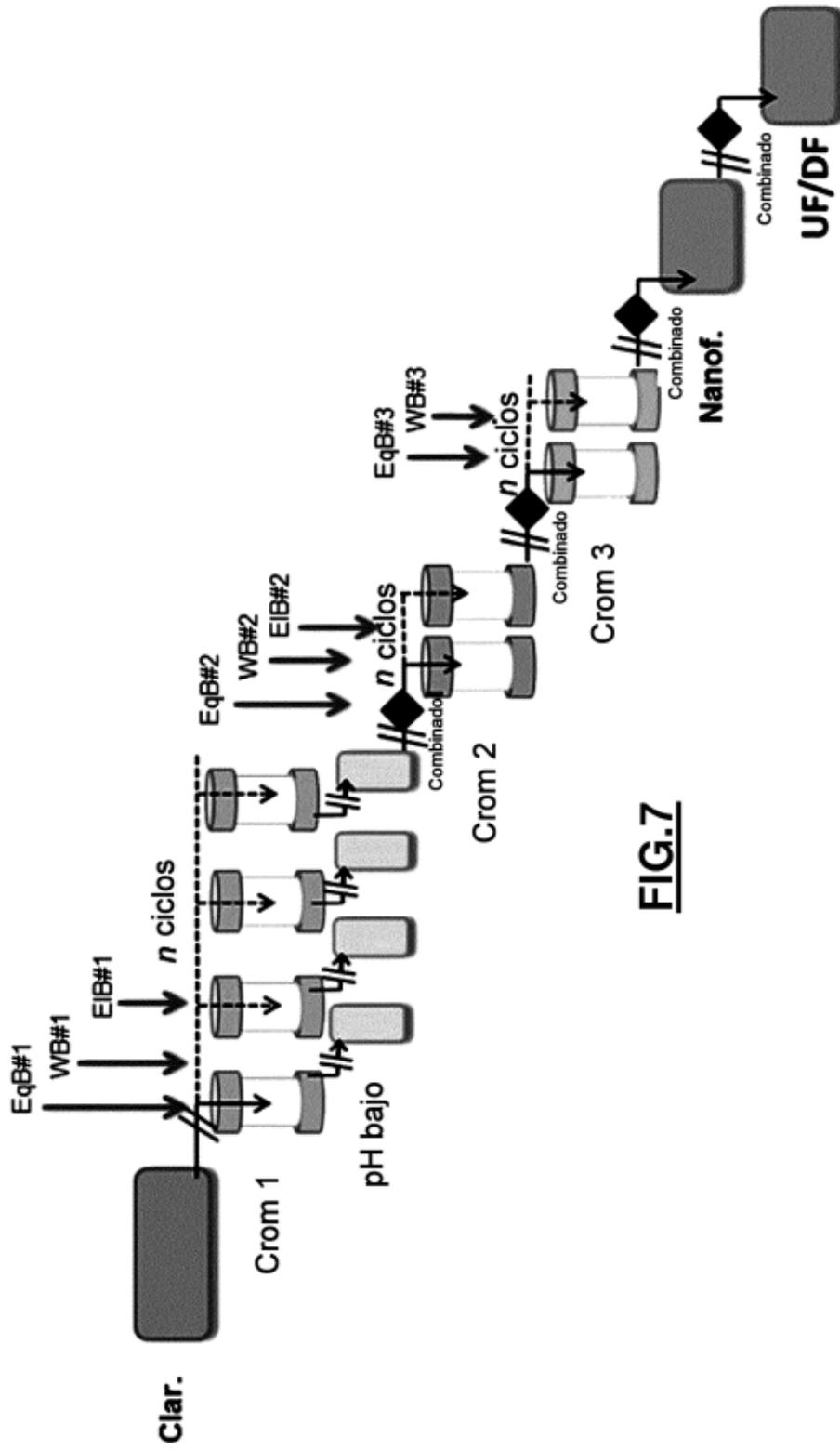


FIG.7

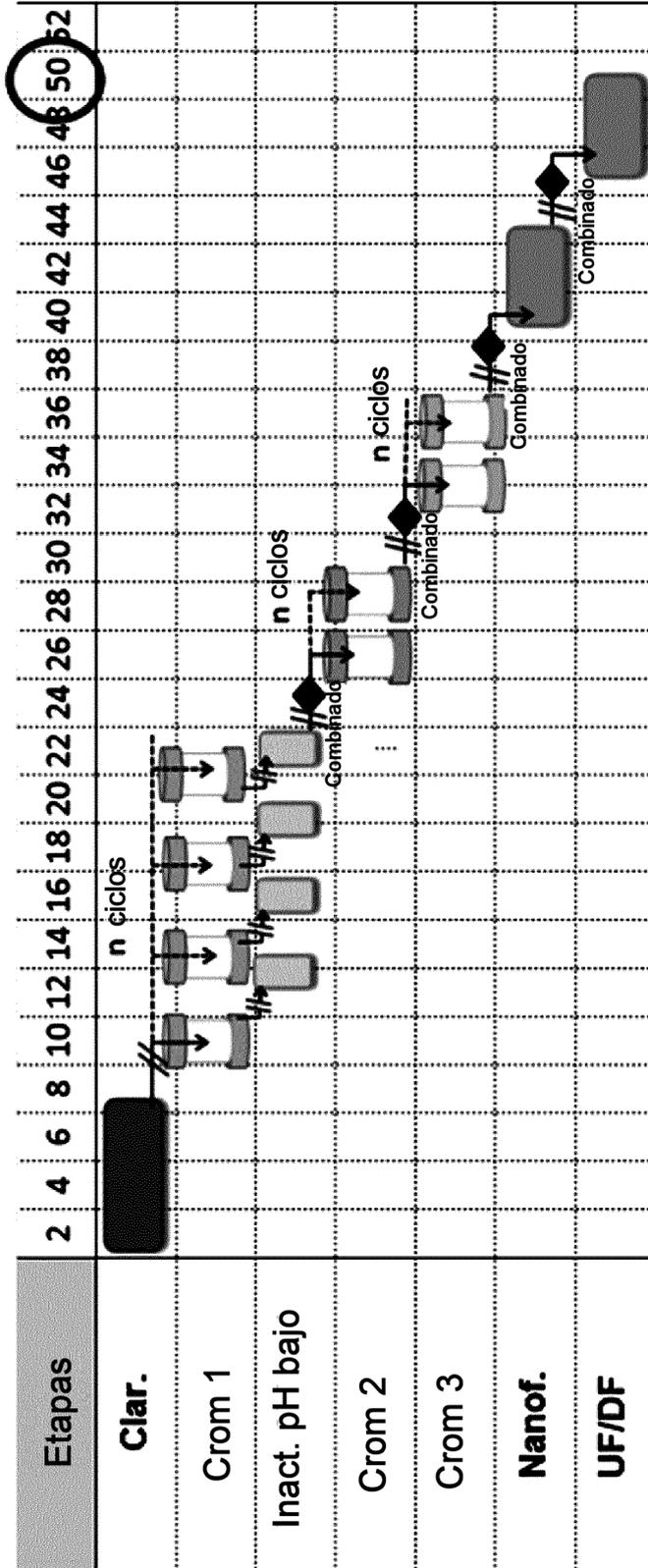


FIG.9

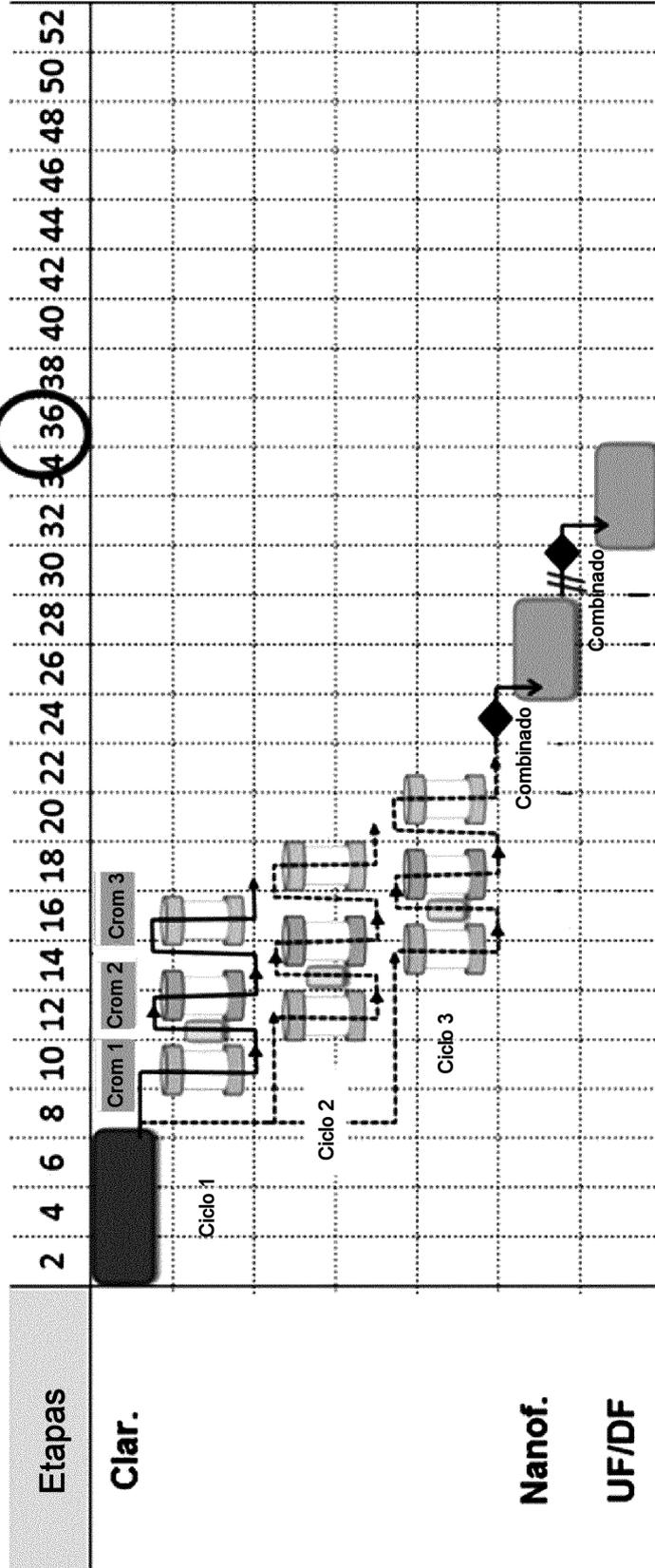


FIG.10

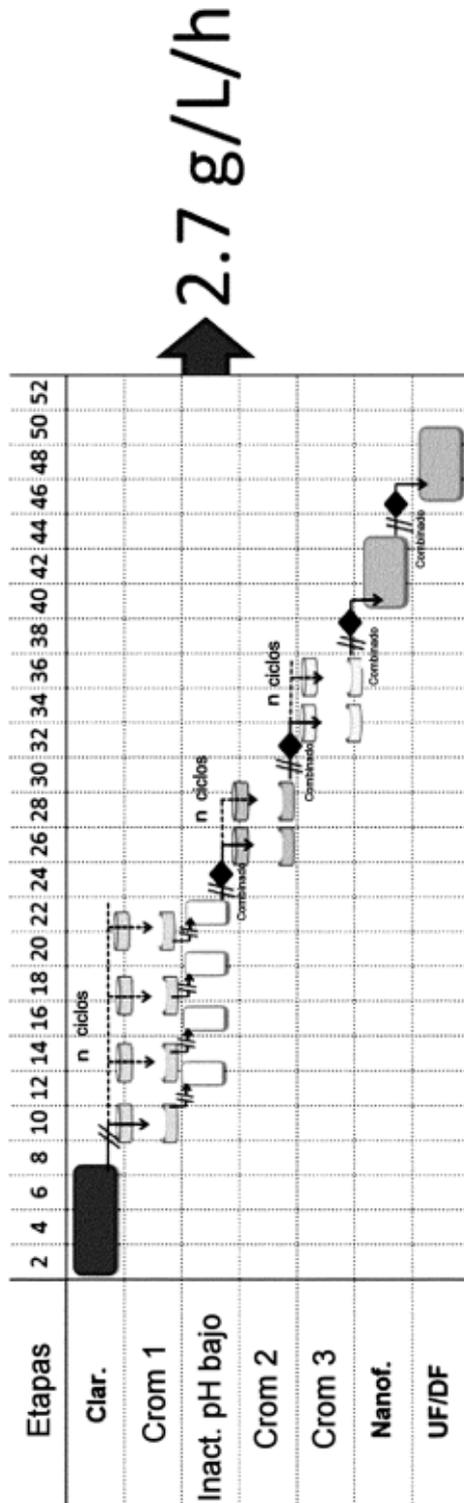


FIG.11

