

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 347**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/16** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/20** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2011 PCT/JP2011/064074**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11162210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2011 E 11798094 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2583973**

54 Título: **Procedimiento para purificar una proteína que utiliza un aminoácido**

30 Prioridad:

**09.02.2011 US 201161441051 P**

**21.06.2010 US 356899 P**

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

**06.06.2018**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)**

**1-6-1, Ohtemachi**

**Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIHARA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 671 347 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**

Procedimiento para purificar una proteína que utiliza un aminoácido.

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento general de purificación de proteínas. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de anticuerpos mediante cromatografía.

**10 Antecedentes de la técnica**

El desarrollo de tecnologías de recombinación genética ha proporcionado una diversidad de compuestos farmacéuticos proteicos. En particular, recientemente se han desarrollado y comercializado numerosos compuestos farmacéuticos de anticuerpos. Además, la purificación a gran escala económica de estos compuestos farmacéuticos proteicos se ha convertido en una cuestión más importante en la industria biofarmacéutica.

Generalmente, dichos compuestos farmacéuticos proteicos se producen mediante el cultivo de células recombinantes en las que se inserta un vector que incluye un gen de la proteína objetivo. El líquido del cultivo incluye impurezas, tales como diversos ingredientes derivados del medio, productos secundarios de las células o similares, además de la proteína objetivo. De esta manera, resulta muy difícil, y constituye un reto, aislar y purificar la proteína para satisfacer los requisitos de pureza de los compuestos farmacéuticos proteicos y combinar además la producción a gran escala anteriormente indicada y la eficiencia económica.

En general, el procedimiento de purificación de la proteína objetivo se lleva a cabo mediante una combinación de diferentes modos de cromatografía. Dicho procedimiento es, por ejemplo, un procedimiento de separación de una mezcla de proteínas a partir de la carga, la hidrofiliidad o el tamaño. Pueden utilizarse varias resinas cromatográficas diferentes en cada uno de dichos procedimientos y también resulta posible adaptarlos con precisión a un plan de purificación para una proteína específica.

La esencia de cada uno de los procedimientos de separación es permitir que las proteínas pasen por una columna larga a diferentes velocidades mediante el incremento de una separación física para que pasen por la columna con mayor rapidez o se lleva a cabo una adhesión selectiva a un medio de separación realizando diferentes eluciones con diferentes solventes. En algunos casos, la proteína objetivo se separa de las impurezas al adherirse éstas a la resina de la columna con bastante facilidad mientras que la proteína objetivo no se une a la misma, es decir, la proteína objetivo se encuentra en el "eluido".

En particular, en el caso de que la proteína objetivo sea un anticuerpo obtenido a partir de células animales como hospedadoras, se lleva a cabo cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G mediante la utilización de la especificidad de unión de la proteína A o la proteína G para la cadena Fc de IgG o similar y se lleva a cabo una combinación de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía en hidroxapatito, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de modo mixto o similar para llevar a cabo la purificación.

Por ejemplo, se aplica un medio de cultivo acuoso que contiene el anticuerpo, obtenido a partir de un cultivo de células de mamífero, a la columna de cromatografía de proteína A o proteína G para adsorber los anticuerpos a la resina de la columna. A continuación, se eluyen los anticuerpos utilizando una solución ácida y el eluido obtenido se aplica secuencialmente a una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de columna de exclusión por tamaño para llevar a cabo la purificación (documento de patente nº 1).

Además, se informa de que la polimerización se inhibe mediante la utilización de un aminoácido, la arginina, como aditivo amortiguador para la cromatografía de afinidad de proteína A, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía hidrofóbica (documentos no de patente nº 1 y nº 2).

**55 Listado de referencias**Documento de patente

[Documento de patente nº 1] Traducción al japonés publicada de la solicitud de patente PCT nº 5-504579.

60

Documentos no de patente

[Documento no de patente nº 1] Protein Expression and Purification 36:244-248, 2004.

65

[Documento no de patente nº 2] Protein Expression and Purification 54:110-116, 2007.

**Sumario de la invención**Problemas que debe resolver la invención

- 5 Sin embargo, la determinación de las condiciones cromatográficas o la combinación de diferentes procedimientos cromatográficos requiere mucho tiempo, trabajo y costes y resulta complicado. Además, no se garantiza que la purificación pueda llevarse a cabo a satisfacción de los requisitos de pureza para los compuestos farmacéuticos proteicos.
- 10 Además, el modo y propósito de la utilización de las tecnologías indicadas en los documentos no de patente nº 1 y nº 2 son limitados, es decir, sólo se utiliza la arginina como aminoácido de adición y el efecto es únicamente la inhibición de la polimerización y, de esta manera, resulta difícil afirmar que las tecnologías son procedimientos para purificar proteínas que puedan conseguir una pureza elevada.
- 15 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para purificar una proteína que puede proporcionar una pureza elevada mediante la eliminación más segura de impurezas que los procedimientos de purificación convencionales. Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para purificar una proteína capaz de reducir los costes o el trabajo, debido a que los costes o el trabajo pueden ser un gran problema en la purificación a escala industrial.

20 Medios para resolver los problemas

- 25 En el contexto de la presente invención se han realizado amplios estudios para resolver los problemas e inesperadamente se ha descubierto que una proteína objetivo puede purificarse con una pureza más elevada que con los procedimientos convencionales mediante la inclusión de un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o parte de la misma utilizada en por lo menos un proceso cromatográfico en un procedimiento de purificación de una proteína que incluye uno o más procesos cromatográficos, completando de esta manera la presente invención.

30 La presente invención proporciona:

- [1]. Un procedimiento para purificar una proteína, que reduce la cantidad de polímeros y las proteínas de célula hospedadora, que comprende uno o más procesos cromatográficos, en el que uno o más procesos cromatográficos comprende un procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y en el que se incluye glicina como ingrediente del amortiguador de elución utilizado en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A, siendo el contenido de glicina en el amortiguador de elución de 100 mM y siendo el pH del amortiguador de elución de entre 3,2 y 3,4.
- 35 [2]. El procedimiento de purificación según [1], en el que el procedimiento o procedimientos de cromatografía comprenden además un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico.
- 40 [3]. El procedimiento de purificación según [2], en el que se incluye un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o parte de una disolución amortiguadora que se utiliza en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico.
- 45 [4]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [1] a [3], que comprende además, como procedimiento de cromatografía, uno o más procedimientos de cromatografía seleccionados de entre un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, un procedimiento de cromatografía de filtración en gel, un procedimiento de cromatografía hidrofóbica, un procedimiento de cromatografía en hidroxipatito y un procedimiento de cromatografía de modo mixto.
- 50 [5]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [2] a [4], en el que el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A.
- 55 [6]. El procedimiento de purificación según [5], en el que adicionalmente se lleva a cabo después un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico.
- 60 [7]. El procedimiento de purificación según [4], en el que el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico.
- 65 [8]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [2] a [7], en el que un aminoácido incluido como ingrediente de una disolución amortiguadora o parte de una disolución amortiguadora que se utiliza en el procedimiento de cromatográfico de intercambio catiónico es un aminoácido seleccionado de entre ácido glutámico, histidina y glutamina.

[9]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [1] a [8], en el que se añade una sal a una muestra que contiene proteínas que se carga en la cromatografía de afinidad de proteína A en el proceso cromatográfico de afinidad de proteína A.

5

[10]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [2] a [9], en el que la proporción de proteínas de célula hospedadora en el producto de purificación después de completar el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico es inferior a 100 ng/mg.

10

[11]. El procedimiento de purificación según cualquiera de [2] a [10], en el que la proporción de polímeros en el producto de purificación después de completar el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico es inferior a 1,5%.

15

[12]. Un procedimiento para purificar una proteína a fin de reducir la cantidad de polímeros y proteínas de célula hospedadora según cualquiera de [2] a [11], en el que un aminoácido incluido en una formulación farmacéutica de una especialidad farmacéutica que comprende la proteína que se ha purificado mediante el procedimiento de purificación según cualquiera de [2] a [11] a modo de ingrediente activo es idéntico a un aminoácido incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o como una parte de la disolución amortiguadora, utilizada en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico según cualquiera de [2] a [11].

20

Es decir, la presente exposición proporciona (1) a (16), a continuación.

25

(1). Un procedimiento para purificar una proteína, que comprende uno o más procesos cromatográficos, en el que se incluye un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o como una parte de una disolución amortiguadora, utilizada en por lo menos un proceso cromatográfico.

30

(2). El procedimiento de purificación descrito en (1), en el que se incluye un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o como parte de una disolución amortiguadora, utilizada en un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico.

35

(3). El procedimiento de purificación descrito en (2), que comprende además, como procedimiento de cromatografía, un procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y uno o más procesos cromatográficos seleccionados de entre un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, un procedimiento de cromatografía de filtración en gel, un procedimiento de cromatografía hidrofóbica, un procedimiento de cromatografía en hidroxiapatito y un procedimiento de cromatografía de modo mixto.

40

(4). El procedimiento de purificación descrito en (2), en el que el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A.

45

(5). El procedimiento de purificación descrito en (4), en el que adicionalmente se lleva a cabo después el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico.

50

(6). El procedimiento de purificación descrito en (3), en el que el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico.

55

(7). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (4) a (6), en el que se incluye un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora, utilizada en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A.

60

(8). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (4) a (7), en el que la disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A es una disolución amortiguadora que comprende glicina como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora.

65

(9). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (3) a (8), en el que un aminoácido incluido como ingrediente de una disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico es un aminoácido seleccionado de entre ácido glutámico, histidina y glutamina.

(10). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (4) a (9), en el que un aminoácido incluido como ingrediente de una disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A es un aminoácido seleccionado de entre glicina y treonina.

- 5 (11). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (4) a (10), en el que se añade una sal a una muestra que contiene una proteína, que se carga en la cromatografía de afinidad de proteína A en el proceso cromatográfico de afinidad de proteína A.
- (12). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (2) a (11), en el que la proporción de proteínas de célula hospedadora en el producto de purificación tras completar el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico es inferior a 100 ng/mg.
- 10 (13). El procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (2) a (12), en el que la proporción de polímeros en el producto de purificación después de completar el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico es inferior a 1,5%.
- 15 (14). Un procedimiento para purificar una proteína, en el que un aminoácido incluido en una formulación farmacéutica de una especialidad farmacéutica que comprende la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación descrito en cualquiera de (3) a (13) como ingrediente activo es idéntico a un aminoácido incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico descrito en cualquiera de (3) a (13).
- 20 (15). El procedimiento de purificación descrito en (2), que comprende además, como procedimiento de cromatografía, por lo menos un proceso cromatográfico seleccionado de entre un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, un procedimiento cromatografía de filtración en gel, un procedimiento de cromatografía hidrofóbica, un procedimiento de cromatografía en hidroxiapatito y un procedimiento de cromatografía de modo mixto.
- 25 (16). El procedimiento de purificación descrito en (1), que comprende además, como proceso cromatográfico, un procedimiento de cromatografía seleccionado de entre un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, un procedimiento de cromatografía de filtración en gel, un procedimiento de cromatografía hidrofóbica, un procedimiento de cromatografía en hidroxiapatito y un procedimiento de cromatografía de modo mixto.
- 30

### Efecto de la invención

- 35 Una proteína objetivo, tal como un anticuerpo, puede purificarse mediante el procedimiento de purificación de una proteína según la presente invención con el fin de reducir en gran medida la cantidad de impurezas incluidas en la proteína purificada (por ejemplo, la cantidad de polímeros o proteínas de célula hospedadora) de manera que la proteína objetivo puede purificarse con alta pureza.
- 40 Además, según el procedimiento de purificación de la presente invención, resulta posible purificar una proteína con alta pureza mediante la inclusión de un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o como una parte de una disolución amortiguadora en un procedimiento de cromatografía. Por lo tanto, una parte de las etapas del procedimiento convencional de purificación de proteína puede ser eliminado, de manera que se espera una simplificación del dispositivo de purificación de la proteína y beneficios económicos por el mayor rendimiento.
- 45

### Breve descripción de los dibujos.

- 50 La figura 1 representa la proporción de polímeros contenidos en los productos de purificación tras completar cada procedimiento en los procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose XL) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF), en el que el eje vertical representa la proporción de los polímeros.
- 55 La figura 2 representa la proporción de proteínas de célula hospedadora contenidas en los productos de purificación tras completar cada procedimiento de los procedimientos de purificación que utilizan una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose XL) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF), en el que el eje vertical representa la proporción de proteínas de célula hospedadora.
- 60 La figura 3 representa la proporción de polímeros contenidos en los productos de purificación después de completar cada procedimiento en los procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Toyopearl Gigacap Q) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Fractogel SE HiCap), en la que el eje vertical representa la proporción de los polímeros.
- 65

La figura 4 representa la proporción de proteínas de célula hospedadora contenidas en los productos de purificación después de completar cada procedimiento en procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Toyopearl Gigacap Q) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Fractogel SE HiCap), en la que el eje vertical represente la proporción de proteínas de célula hospedadora.

La figura 5 representa la proporción de polímeros contenidos en los productos de purificación después de completar cada procedimiento en procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Toyopearl Gigacap Q) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Fractogel SE HiCap), en la que el eje vertical representa la proporción de polímeros (hasta el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, se lleva a cabo el mismo procedimiento en el procedimiento 1 y en el procedimiento 2 y, de esta manera, la proporción de polímeros es idéntica).

La figura 6 representa la proporción de polímeros contenidos en los productos de purificación después de completar cada procedimiento en los procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Toyopearl Gigacap Q) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF), en la que el eje vertical representa la proporción de los polímeros.

La figura 7 representa la proporción de proteínas de célula hospedadora contenidas en los productos de purificación después de completar cada procedimiento en los procedimientos de purificación utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe), una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Toyopearl Gigacap Q) y una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF). El eje vertical represente la proporción de proteínas de célula hospedadora.

#### Formas de realización para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento según las reivindicaciones para purificar una proteína, que incluye uno o más procesos cromatográficos, en el que se incluye un aminoácido como ingrediente de una disolución amortiguadora o de una parte de la una disolución amortiguadora utilizada en por lo menos un proceso cromatográfico. El procedimiento de purificación de una proteína de la presente invención se utiliza preferentemente para purificar, en particular, anticuerpos monoclonales.

Según el procedimiento de purificación de la presente invención, puede reducirse la cantidad de impurezas (por ejemplo, la cantidad de polímeros o de proteínas de célula hospedadora) incluida en la proteína purificada, en particular, la cantidad de anticuerpos, y puede purificarse la proteína objetivo con una pureza elevada, mediante la inclusión de un aminoácido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora utilizada en por lo menos un proceso cromatográfico.

Los términos utilizados en la presente memoria pretenden incluir las definiciones siguientes. Por otra parte, la expresión "disolución amortiguadora" utilizada en la presente memoria es sinónima de "amortiguador".

Las sustancias purificadas mediante el procedimiento de purificación de la presente invención son proteínas. De entre las proteínas, resultan preferentes los anticuerpos, y resultan más preferente los anticuerpos monoclonales (anticuerpos de ratón, quiméricos, humanizados o humanos, o dichos anticuerpos modificados en la región Fc).

Entre los ejemplos de muestras que contienen dichas proteínas (en lo sucesivo denominadas muestras que contienen proteínas) puede incluirse, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo puede obtenerse, por ejemplo, mediante el cultivo de células CHO, células de mieloma NS0, células de hibridoma o células de levadura, seguido de la filtración de dicho sobrenadante o similares. En el caso de que la proteína objetivo sea un anticuerpo monoclonal, el contenido de anticuerpo monoclonal del sobrenadante de cultivo preferentemente es de entre 0,1 y 30 g/l, más preferentemente de entre 0,5 y 20 g/l, y mucho más preferentemente de entre 1 y 10 g/l.

Entre los ejemplos de la proteína que debe purificarse pueden incluirse además anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales derivados de suero, leche derivada de un animal transgénico o extracto de planta transgénica.

En el procedimiento de purificación de la presente exposición, entre los ejemplos de los aminoácidos incluidos como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora utilizado en el proceso cromatográfico pueden incluirse, por ejemplo, glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), serina (Ser), treonina (Thr), lisina (Lys), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), prolina (Pro), triptófano (Trp) o histidina (His), o dipéptidos, oligopéptidos o poliaminoácidos de los mismos.

De entre los aminoácidos anteriormente indicados, resultan preferentes la glutamina, la histidina, el ácido glutámico, la glicina, la arginina y la metionina. Mediante la inclusión de dichos aminoácidos como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de una disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico, se mejora adicionalmente la pureza de la proteína que debe purificarse.

5 Entre los ejemplos de las soluciones amortiguador puede incluirse, por ejemplo, un amortiguador de equilibrado, un amortiguador de lavado y un amortiguador de elución.

10 El procedimiento de purificación de la presente invención incluye uno o más procesos cromatográficos. Entre los ejemplos de los procesos cromatográficos incluidos en el procedimiento de la presente invención pueden incluirse un procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A, un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico, un procedimiento de cromatografía de filtración en gel (exclusión por tamaño), un procedimiento de cromatografía hidrofóbica, un procedimiento de cromatografía en hidroxapatito, un procedimiento de cromatografía de modo mixto o similares.

15 Las proteínas se purifican a pureza y rendimiento mucho más elevados mediante combinaciones de dichos procesos cromatográficos basándose en los conocimientos que posee el experto en la materia. Por ejemplo, como procedimiento de purificación de anticuerpos monoclonales, resulta preferido llevar a cabo el proceso cromatográfico de intercambio catiónico después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A. Además, resulta preferido llevar a cabo el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico posteriormente.

20 Además, como purificación de los anticuerpos monoclonales, resulta preferible, por ejemplo, llevar a cabo el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico después del procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y del procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico. Mediante la combinación de los procesos cromatográficos de esta manera, pueden purificarse los anticuerpos monoclonales a pureza y rendimiento más elevados.

25 En lugar de la cromatografía de intercambio catiónico, puede utilizarse la cromatografía hidrofóbica, la cromatografía en hidroxapatito o la cromatografía de modo mixto. Además, la cromatografía de intercambio aniónico puede llevarse a cabo después de la cromatografía de afinidad de proteína A y de la cromatografía de intercambio catiónico.

30 Además, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse sin utilizar la cromatografía de afinidad de proteína A. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo combinaciones de por lo menos dos de entre la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de intercambio aniónico, la cromatografía en hidroxapatito y la cromatografía de modo mixto.

35 En el procedimiento de purificación de la presente invención, no resulta necesaria la inclusión del aminoácido como ingrediente de la disolución amortiguadora o como parte de la disolución amortiguadora en todos los procesos cromatográficos, aunque el aminoácido se incluye como ingrediente de la disolución amortiguadora o como una parte de la disolución amortiguadora en por lo menos un proceso cromatográfico.

40 Además, en cada proceso cromatográfico, el aminoácido puede incluirse como ingrediente de la totalidad de amortiguador de equilibrado, amortiguador de lavado y amortiguador de elución, o de una parte de ellos. El aminoácido puede incluirse también en sólo algunos de los amortiguadores.

45 En la presente invención, la expresión "que incluye un aminoácido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora" se refiere a que el aminoácido es el ingrediente mismo de la disolución amortiguadora o a que el aminoácido se incluye en una parte de los ingredientes de la disolución amortiguadora. En el procedimiento de purificación de la presente exposición puede ajustarse el contenido de aminoácido en la disolución amortiguadora utilizada en por lo menos un proceso cromatográfico según los tipos de proteína objetivo, el aminoácido, el proceso cromatográfico y similares.

50 Específicamente, el contenido del aminoácido en el amortiguador de equilibrado o en el amortiguador de elución de la exposición es preferentemente, por ejemplo, de entre 10 y 1.000 mM, y más preferentemente de entre 10 y 100 mM. Además, el contenido del aminoácido en el amortiguador de lavado preferentemente es de entre 0,5 y 3 M, y más preferentemente de entre 0,5 y 1 M.

55 Además, entre 0,1 y 2 M de un aminoácido puede incluirse preferentemente en la muestra que contiene la proteína que se carga en la cromatografía, haciendo posible reducir el nivel de impurezas sin un procedimiento de lavado.

60 Entre los ejemplos de los procesos cromatográficos, que preferentemente incluyen el aminoácido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora, se incluyen el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y el procedimiento de cromatografía de intercambio

catiónico.

Específicamente, en el caso (1) o (2) a continuación, por ejemplo, resulta preferido incluir glicina o treonina como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A. Además resulta preferido incluir un aminoácido seleccionado de entre ácido glutámico, histidina y glutamina como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora utilizada en el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico.

(1) El caso en que se lleva a cabo un procedimiento de cromatografía de proteína A, seguido de un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico, preferentemente seguido adicionalmente de llevar a cabo un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico.

(2) El caso en que se lleva a cabo un procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A y un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico, seguido de llevar a cabo un procedimiento de intercambio catiónico.

En combinaciones de una pluralidad de procesos cromatográficos, resulta preferido incluir el aminoácido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico final. Lo anterior se debe a que existe la ventaja de que el intercambio de la disolución amortiguadora no resulta necesario en el caso de que el aminoácido incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico final en el procedimiento de purificación de la presente invención sea idéntico al aminoácido incluido en la disolución amortiguadora utilizada en la formulación farmacéutica que contiene la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación.

Por ejemplo, en la combinación de la cromatografía de intercambio catiónico posterior a la cromatografía de afinidad de proteína A y la cromatografía de intercambio aniónico, el aminoácido preferentemente se incluye como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico como procedimiento final.

A continuación en la presente memoria se describe el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A, el procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico o el procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico.

(Procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A)

Entre los ejemplos de resinas para la cromatografía de afinidad de proteína A puede incluirse MabSelect, proteína A-Sepharose FF, MabSelect Xtra y MabSelect SuRe, todos fabricados por GE, y Prosep vA Hicapacity, Prosep vA Ultra y Prosep Ultraplus, todos fabricados por Millipore, y similares, aunque no se encuentran limitados a ellos. Entre los ejemplos de columnas pueden incluirse aquellos con una longitud de entre 2,5 y 40 cm.

En el caso de que se cargue la muestra que contiene proteínas en la columna de cromatografía de afinidad de proteína A, resulta preferido que la columna de cromatografía de afinidad de proteína A se equilibre previamente con el amortiguador de equilibrado.

Entre los ejemplos de amortiguadores de equilibrado se incluyen Tris, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico, Bis-Tris, Bis-Tris propano y HEPS, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]jetanosulfónico, MES, ácido 2-morfolinoetanosulfónico y similares, aunque no se encuentran limitados a los mismos. Típicamente, el pH del amortiguador de equilibrado preferentemente es de entre 5,0 y 9,0.

Puede incluirse un procedimiento de lavado antes de la elución de la proteína objetivo. En el caso de la cromatografía de afinidad de proteína A, se incluye un procedimiento de lavado que utiliza 5 volúmenes de columna de disolución amortiguadora de Tris 10 mM-NaCl 1 mM (pH 7,0) o una disolución amortiguadora preparada mediante la adición de 0,5 a 3 M de aminoácido, o se incluye un dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo en Tris 10 mM antes de la elución de la proteína objetivo, eliminando de esta manera las sustancias adsorbidas no específicas que se adsorben a la resina de la columna.

Alternativamente, preferentemente la cromatografía de afinidad de proteína A se lleva a cabo añadiendo directamente preferentemente 0,1 a 2 M de aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo a la muestra que contiene proteínas que se carga en la cromatografía de afinidad de proteína A.

Mediante dicho procedimiento puede reducirse el nivel de impurezas sin el procedimiento de lavado. En lugar del aminoácido, resulta preferido añadir la misma concentración de una sal, tal como NaCl, MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub>, a la muestra que contiene proteínas que se carga en la cromatografía de afinidad de proteína A debido a que puede

obtenerse un efecto similar.

Entre los ejemplos de los amortiguadores de elución utilizados en el procedimiento de cromatografía de afinidad de proteína A puede incluirse una disolución amortiguadora que contiene 10 a 100 mM de glicina, treonina u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo, aunque no se encuentran limitados a ellos. Típicamente, el pH de la disolución amortiguadora preferentemente es de entre 2,5 y 4,5.

Típicamente, la velocidad lineal de carga de la muestra que contiene proteínas y de paso de la disolución amortiguadora por la columna de cromatografía de afinidad de proteína A preferentemente es de entre 50 y 1.000 cm/h.

(Procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico)

Entre los ejemplos de resinas para la cromatografía de intercambio aniónico pueden incluirse Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, ANX Sepharose FF, Capto Q y Capto DEAE, todos fabricados por GE, TOYOPEARL GigaCap Q-650 y TOYOPEARL SuperQ-650, todos fabricados por TOSOH; Fractogel DEAE, Fractogel TMAE, Fractogel TMAE Hicap y ESHMUNO Q, todos fabricados por Merck, y similares, aunque no se encuentran limitados a ellos. Se preparó una columna con la longitud apropiada con dichas resinas y se utilizó. la longitud de la columna preferentemente es de entre 2,5 y 40 cm. Además, resulta posible utilizar una membrana de intercambio aniónico.

Entre los ejemplos de los amortiguadores de equilibrado de la cromatografía de intercambio aniónico puede incluirse una disolución amortiguadora que contiene 10 a 100 mM de histidina u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo, una disolución amortiguadora de Tris, una disolución amortiguadora preparada mediante la adición de 5 a 100 mM de treonina u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo en 10 a 100 mM de Tris, y similares, aunque no se encuentran limitados a ellos. Típicamente, el pH del amortiguador preferentemente es de entre 5,0 y 9,0.

Típicamente la velocidad lineal de carga de la muestra que contiene proteínas y de paso de la disolución amortiguadora por la columna de cromatografía de intercambio aniónico preferentemente es de entre 50 y 1.000 cm/h.

(Procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico)

Entre los ejemplos de columnas de cromatografía de intercambio catiónico pueden incluirse SP Sepharose FF, CM Sepharose FF, SP Sepharose XL y Capto S, todas fabricadas por GE; Poros 50 HS y Poros 50 XS, todas fabricadas por Applied Biosystems; ESHMUNO S, Fractogel COO-, Fractogel SO3- y Fractogel SE Hicap, todas fabricadas por Merck; TOYOPEARL GigaCap S-650 y TOYOPEARL GigaCap CM-650, todas fabricadas por TOSOH, y similares, aunque sin limitarse a ellas. Típicamente, la longitud de la columna preferentemente es de entre 2,5 y 40 cm.

Entre los ejemplos de los amortiguadores de equilibrado de la cromatografía de intercambio catiónico pueden incluirse 10 a 100 mM de amortiguador MES, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico o ácido fosfórico, una disolución amortiguadora que contiene 10 a 100 mM de ácido glutámico u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido de los mismos y similares, aunque sin limitarse a ellos. Típicamente, el pH del amortiguador preferentemente es de entre 4,0 y 8,0.

Entre los ejemplos de los amortiguadores de elución utilizados en la cromatografía de intercambio catiónico puede incluirse una disolución amortiguadora preparada mediante la adición de arginina u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo a un amortiguador de MES 10 a 100 mM, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico o ácido fosfórico, o una disolución amortiguadora preparada mediante la adición de una sal, tal como NaCl a 10 a 100 mM de ácido glutámico u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo y una disolución amortiguadora que contiene 10 a 1.000 mM de ácido glutámico u otro aminoácido, o dipéptido, oligopéptido o poliaminoácido del mismo, aunque sin limitarse a ellos. Típicamente, el pH del amortiguador preferentemente es de entre 4,0 y 8,0.

Típicamente, la velocidad lineal de carga de la muestra que contiene proteína y de paso de la disolución amortiguadora por la columna de cromatografía de intercambio catiónico preferentemente es de entre 50 y 1.000 cm/h.

El procedimiento de elución de la cromatografía de intercambio catiónico puede ser cualquiera de entre elución en gradiente realizada mediante el incremento gradual de la concentración del amortiguador de elución o la elución escalonada utilizando los amortiguadores de elución.

Al considerar la fabricación a escala industrial de especialidades farmacéuticas que contienen la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación de la presente invención como ingrediente activo y, en el

caso de que el proceso cromatográfico de intercambio catiónico se lleve a cabo como proceso cromatográfico final, la utilización de una disolución amortiguadora idéntica a la presente en la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico proporciona la posibilidad de que no se requiera el necesario intercambio de amortiguador hasta que se haya completado finalmente la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas después del proceso cromatográfico de intercambio catiónico.

Por lo tanto, en el procedimiento de purificación de la presente invención, el aminoácido incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o como parte de la disolución amortiguadora utilizado en el proceso cromatográfico final que se utiliza preferentemente en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico preferentemente es idéntico al aminoácido incluido en la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas.

Es decir, la presente exposición proporciona además una formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas que incluye la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación de la presente invención como ingrediente activo e incluye además un aminoácido idéntico al incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico final, utilizado preferentemente en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico, del procedimiento de purificación de la presente invención.

Además, mediante la utilización de un aminoácido idéntico al incluido en la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas en todos los procesos cromatográficos del procedimiento de purificación de la presente invención, se esperan más beneficios económicos mediante la reducción del número de materias primas o la simplificación del dispositivo de purificación de la proteína.

Por lo tanto, resulta preferido que el aminoácido incluido como ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la disolución amortiguadora en el proceso cromatográfico del procedimiento de purificación de la presente invención sea idéntico al incluido en la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas.

Más preferentemente, se incluye glutamina, ácido glutámico, histidina, arginina o metionina en la disolución amortiguadora utilizada en el proceso cromatográfico del procedimiento de purificación de la presente exposición y en la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas que incluyen la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación de la presente invención como ingrediente activo.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de pureza elevada mediante la purificación de los anticuerpos monoclonales según el procedimiento de purificación de la presente invención. Con respecto a un polímero, la expresión "pureza elevada" se refiere a que la proporción del polímero en el producto de purificación purificado mediante el procedimiento de purificación de la presente invención es preferentemente inferior a 4%, más preferentemente inferior a 3,5% y mucho más preferentemente inferior a 1%.

Además, con respecto a una proteína de célula hospedadora, el contenido de proteína derivada de la célula hospedadora (proteína hospedadora) en el producto de purificación purificado mediante el procedimiento de purificación de la presente invención es preferentemente inferior a 1.000 ng/mg (inferior a 1.000 ng de proteína de célula hospedadora por cada 1 mg de proteína), más preferentemente inferior a 100 ng/mg y mucho más preferentemente inferior a 10 ng/mg.

Resulta posible determinar la concentración del polímero o de la proteína hospedadora en el producto de purificación mediante la utilización de procedimientos conocidos por el experto en la materia (por ejemplo ELISA para la proteína de célula hospedadora o HPLC de filtración en gel para el polímero).

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Purificación mediante la utilización de MabSelect, Q Sepharose XL y SP Sepharose FF.

Se aplicaron 86 ml del sobrenadante de cultivo de células CHO que contenían anticuerpos monoclonales humanos, que habían sido clarificados mediante microfiltración, a una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect, fabricada por GE, 10 mm de DI x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con una disolución amortiguadora de Tris 10 mM (pH 7,0). Tras la aplicación del sobrenadante de cultivo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de un amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 500 cm/h).

A continuación, los anticuerpos monoclonales humanos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de un amortiguador de elución (pH 3,2) mostrado en la Tabla 1 (velocidad lineal: 500 cm/h). El eluido se neutralizó hasta pH 7,0 con Tris 1,5 M.

El líquido neutralizado se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose XL, fabricada por GE, 3 mm de DI x 20 cm) (velocidad lineal: 300 cm/h) equilibrada con un amortiguador de

intercambio aniónico (pH 7,0) mostrado en la Tabla 1. Tras completar la aplicación, se pasaron 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado por la columna. La fracción no adsorbida de la columna se agrupó como eluido de anticuerpos monoclonales humanos.

5 Se ajustó el pH del líquido agrupado de Q Sepharose XL a 5,0 con ácido cítrico 1 M y después se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF, fabricada por GE, 10 mm de DI x 20 cm) (velocidad lineal: 200 cm/h) equilibrada con un amortiguador de equilibrado de intercambio catiónico (pH 5,0) de la Tabla 1. Tras completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 200 cm/h).

10 A continuación, los anticuerpos monoclonales humanos se eluyeron con un gradiente de concentración salina de concentración salina gradualmente creciente hasta 0,35 M (20 volúmenes de columna) utilizando el amortiguador de elución de intercambio catiónico (pH 4,5) mostrado en la Tabla 1 (velocidad lineal: 200 cm/h).

15 [Tabla 1]

Proceso	Disolución amortiguadora	Procedimiento 1 (aminoácido utilizado)	Procedimiento 2 (aminoácido utilizado)	Procedimiento 3
Proteína A	Amortiguador de elución	Glicina 10 mM pH 3,2	Treonina 100 mM pH 3,2	Ácido cítrico 20 mM pH 3,2
Intercambio aniónico	Amortiguador de equilibrado	Histidina 20 mM pH 7,0	Tris 10 mM pH 7,0 treonina 10 mM	Tris 10 mM pH 7,0
Intercambio catiónico	Amortiguador de equilibrado	MES 80 mM pH 5,0	Ácido glutámico 80 mM pH 5,0	MES 80 mM pH 5,0
	Amortiguador de elución	MES 80 mM pH 4,5 arginina 0,35 M	Ácido glutámico 80 mM pH 4,5 NaCl 0,35 M	MES 80 mM pH 4,5 NaCl 0,35 M

20 Los resultados de purificación de los anticuerpos monoclonales humanos del presente Ejemplo se muestran en las figuras 1 y 2. Tal como se muestra en las figuras 1 y 2, se encontró que los procedimientos 1 y 2 de inclusión de un aminoácido en la disolución amortiguadora utilizada en el proceso cromatográfico eran excelentes en términos de pureza (contenido de polímeros y proteínas de célula hospedadora) en comparación con el procedimiento 3 de no inclusión de ningún aminoácido en la disolución amortiguadora.

25 **Ejemplo 2. Purificación mediante la utilización de MabSelect SuRe, TOYOPEARL GigaCap Q y Fractogel SE HiCap.**

30 Se aplicaron 86 ml del sobrenadante de cultivo de células CHO que contenía anticuerpos monoclonales humanos, que había sido clarificado mediante microfiltración, en una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe, fabricada por GE, 10 mm de DI x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con una disolución amortiguadora de Tris 10 mM (pH 7,0). Tras la aplicación del sobrenadante de cultivo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 500 cm/h).

35 A continuación, se eluyeron los anticuerpos monoclonales humanos con 5 volúmenes de columna del amortiguador de elución (pH 3,2) mostrado en la Tabla 1 (velocidad lineal: 500 cm/h). El eluido se neutralizó hasta pH 7,0 con Tris 1,5 M.

40 El líquido neutralizado se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (TOYOPEARL GigaCap Q, fabricada por TOSOH, DI de 3 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con el amortiguador de intercambio aniónico (pH 7,0) mostrado en la Tabla 1. Tras completar la aplicación, se pasaron 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado por la columna. La fracción no adsorbida de la columna se agrupó como eluido de anticuerpo monoclonal humano.

45 Se ajustó el pH del líquido agrupado de TOYOPEARL GigaCap Q a pH 5,0 con ácido cítrico 1 M y después se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Fractogel SE Hicap, fabricada por Merck, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 200 cm/h) equilibrada con el amortiguador de equilibrado de intercambio catiónico (pH 5,0) de la Tabla 1.

50 Tras completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 200 cm/h). Después, se eluyeron los anticuerpos monoclonales humanos con un gradiente de concentración salina de concentración salina gradualmente creciente hasta 0,35 M (20 volúmenes de columna) utilizando el amortiguador de elución de intercambio catiónico (pH 4,5) mostrado en la Tabla 1 (velocidad lineal: 200 cm/h).

Los resultados de purificación de los anticuerpos monoclonales humanos mediante el presente procedimiento se muestran en las figuras 3 y 4. Tal como se muestra en las figuras 3 y 4, se encontró que los procedimientos 1 y 2 de inclusión de un aminoácido en la disolución amortiguadora utilizada en el proceso cromatográfico son excelentes en términos de pureza (contenido de polímeros y de proteínas de célula hospedadora) en comparación con el procedimiento 3 de no inclusión de ningún aminoácido en la disolución amortiguadora.

**Ejemplo 3. Purificación mediante la utilización de un aminoácido en un proceso cromatográfico de intercambio catiónico.**

Se aplicaron 245 ml del sobrenadante de cultivo de las células CHO que contenían anticuerpos monoclonales humanos, que habían sido clarificados mediante microfiltración, a una columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe, fabricada por GE, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con la disolución amortiguadora de Tris 10 mM (pH 7,0) mostrada en la Tabla 2. Tras la aplicación del sobrenadante de cultivo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 500 cm/h).

Después, los anticuerpos monoclonales humanos se eluyeron con 5 volúmenes de columna del amortiguador de elución (glicina 100 mM, pH 3,4) mostrado en la Tabla 2 (velocidad lineal: 500 cm/h). El eluido se neutralizó a pH 7 con NaOH 1 M.

El líquido neutralizado se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Gigacap Q, fabricado por TOSOH, DI de 3 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con un amortiguador de intercambio aniónico (amortiguador Tris 10 mM, pH 7,0) mostrado en la Tabla 2. Tras completar la aplicación, se pasaron por la columna 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado. La fracción no adsorbida en la columna se agrupó como eluido de anticuerpos monoclonales humanos.

Se ajustó el pH del líquido agrupado de la columna Gigacap Q a 5,0 con ácido clorhídrico 1 M y se dividió equitativamente (alícuotas de 16 ml). A continuación, se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico bajo las condiciones del procedimiento 1 (mediante la utilización de aminoácido) y del procedimiento 2, respectivamente.

Se aplicó el líquido de carga a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Fractogel SE Hicap, fabricada por Merck, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 200 cm/h) equilibrada con el amortiguador de equilibrado de intercambio catiónico (pH 5,0) de la Tabla 2.

Tras completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 200 cm/h). A continuación, se eluyeron los anticuerpos monoclonales humanos con un gradiente gradualmente creciente del amortiguador de elución mostrado en la Tabla 2 (20 volúmenes de columna) utilizando el amortiguador de elución de intercambio catiónico (pH 5,0) (velocidad lineal: 200 cm/h).

[Tabla 2]

Proceso	Disolución amortiguadora	Procedimiento 1 (utilización de aminoácido)	Procedimiento 2
Proteína A	Amortiguador de equilibrado	Tris 10 mM, pH 7,0	
	Amortiguador de elución	Glicina 100 mM, pH 3,4	
Intercambio aniónico	Amortiguador de equilibrado	Tris 10 mM, pH 7,0	
Intercambio catiónico	Amortiguador de equilibrado	Ácido glutámico 20 mM, pH 5,0	Ácido cítrico 20 mM, pH 5,0
	Amortiguador de elución	Ácido glutámico 600 mM, pH 5,0	Ácido cítrico 600 mM, pH 5,0

Los resultados de purificación de anticuerpos monoclonales humanos mediante el presente procedimiento se muestran en la figura 5. Tal como se muestra en la figura 5, se encontró que el procedimiento 1 de inclusión del aminoácido en la disolución amortiguadora utilizado en el proceso cromatográfico resulta excelente en términos de pureza (contenido de polímeros) en comparación con el procedimiento 2, de no inclusión de ningún aminoácido en la disolución amortiguadora.

**Ejemplo 4. Purificación mediante la utilización exclusiva de una disolución amortiguadora que utiliza un aminoácido (histidina) que es un ingrediente de una disolución amortiguadora para la formulación farmacéutica de las especialidades farmacéuticas.**

5 Se aplicaron 99 ml del sobrenadante de cultivo de las células CHO que contenían anticuerpos monoclonales humanos, que habían sido clarificados mediante microfiltración, en la columna de cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe, fabricada por GE, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: de 403 a 500 cm/h) equilibrada con la disolución amortiguadora con histidina 10 mM (pH 7,0) mostrada en la Tabla 3. Tras la aplicación del sobrenadante de cultivo, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 500 cm/h).

10 A continuación, se eluyeron los anticuerpos monoclonales humanos con 5 volúmenes de columna del amortiguador de elución (histidina 50 mM, pH 3,4) mostrado en la Tabla 3 (velocidad lineal: 500 cm/h). El eluido se neutralizó hasta pH 7 con NaOH 1 M.

15 Se aplicó el líquido neutralizado a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (TOYOPEARL GigaCap Q, fabricada por TOSOH, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 500 cm/h) equilibrada con el amortiguador de intercambio aniónico (histidina 10 mM, pH 7,0) mostrado en la Tabla 3. Tras completar la aplicación, se pasaron por la columna 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado. Se agrupó la fracción no adsorbida a la columna como eluido de anticuerpos monoclonales humanos.

20 Se ajustó el pH del líquido agrupado de la columna TOYOPEARL GigaCap Q a 4,5 con ácido clorhídrico 1 M y después se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF, fabricada por GE, DI de 10 mm x 20 cm) (velocidad lineal: 200 cm/h) equilibrada con el amortiguador de equilibrado de intercambio catiónico (histidina 50 mM, pH 4,5) de la Tabla 3.

25 Tras completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrado (velocidad lineal: 200 cm/h). A continuación, se eluyeron los anticuerpos monoclonales humanos con un gradiente gradualmente creciente del amortiguador de elución mostrado en la Tabla 3 (20 volúmenes de columna) utilizando un amortiguador de elución de intercambio catiónico (histidina 250 mM, pH 6,0) (velocidad lineal: 200 cm/h).

30 [Tabla 3]

Proceso	Disolución amortiguadora	Procedimiento
Proteína A	Amortiguador de equilibrado	Histidina 10 mM, pH 7,0
	Amortiguador de elución	Histidina 50 mM, pH 3,4
Intercambio aniónico	Amortiguador de equilibrado	Histidina 10 mM, pH 7,0
Intercambio catiónico	Amortiguador de equilibrado	Histidina 50 mM, pH 4,5
	Amortiguador de elución	Histidina 250 mM, pH 6,0

35 Los resultados de la purificación de los anticuerpos monoclonales humanos del presente procedimiento se muestran en las figuras 6 y 7. Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, la proporción de polímero era inferior a 1% y la concentración de proteínas de célula hospedadora era inferior a 50 ppm en el producto de purificación del proceso cromatográfico de intercambio catiónico. Esta pureza constituye un nivel de calidad suficiente para la utilización en especialidades farmacéuticas.

40 Además, se encontró que la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación de la presente invención, que incluía el aminoácido en la disolución amortiguadora utilizada en el proceso cromatográfico, era excelente en términos de pureza (contenido de polímero y de proteína de célula hospedadora) en comparación con el procedimiento de no inclusión de ningún aminoácido en la disolución amortiguadora utilizada en el proceso cromatográfico, tal como en el procedimiento 3 de la Tabla 1 que se examinó en los Ejemplos 1 y 2 (ver las figuras 1 a 4).

45 Por ejemplo, al incluir el aminoácido en la disolución amortiguadora, la cantidad de proteínas de célula hospedadora (ver la figura 7) en el producto de purificación después de la columna de cromatografía de intercambio catiónico era de 20% o inferior al caso de no inclusión de ningún aminoácido en la disolución amortiguadora (ver el procedimiento 3 de las figuras 2 y 4).

50 Además, tal como en el presente ejemplo, el anticuerpo puede purificarse mediante la utilización exclusiva de una disolución amortiguadora que contiene un tipo de aminoácido y la utilización de este mismo aminoácido como el ingrediente amortiguador de la formulación farmacéutica, dando lugar a la posibilidad de reducir el

número de materias primas utilizadas en la purificación o a la posibilidad de eliminar el procedimiento de intercambio de amortiguador y, de esta manera, se esperan más beneficios económicos por reducción de los costes de las materias primas y la simplificación del dispositivo de purificación de proteínas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para purificar una proteína para reducir la cantidad de polímeros y proteínas de célula hospedadora, que comprende uno o más procesos cromatográficos, en el que dichos uno o más procesos cromatográficos comprenden un proceso cromatográfico de afinidad de proteína A y en el que se incluye la glicina como el ingrediente por sí mismo del amortiguador de elución utilizado en el proceso cromatográfico de afinidad de proteína A, siendo el contenido de glicina en el amortiguador de elución 100 mM y siendo el pH del amortiguador de elución de 3,2 a 3,4.
- 10 2. Procedimiento de purificación según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más procesos cromatográficos comprenden además un proceso cromatográfico de intercambio catiónico.
- 15 3. Procedimiento de purificación según la reivindicación 2, en el que se incluye un aminoácido como un ingrediente de una disolución amortiguadora o una parte de la misma que se utiliza en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico.
- 20 4. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además, como proceso cromatográfico, uno o más procesos cromatográficos seleccionados de entre un proceso cromatográfico de intercambio aniónico, un proceso cromatográfico de filtración en gel, un proceso cromatográfico hidrófobo, un proceso cromatográfico en hidroxapatito y un proceso cromatográfico de modo mixto.
- 25 5. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el proceso cromatográfico de intercambio catiónico se lleva a cabo a continuación del proceso cromatográfico de afinidad de proteína A.
- 30 6. Procedimiento de purificación según la reivindicación 5, en el que se lleva a cabo a continuación además un proceso cromatográfico de intercambio aniónico.
- 35 7. Procedimiento de purificación según la reivindicación 4, en el que el proceso cromatográfico de intercambio catiónico se lleva a cabo a continuación del proceso cromatográfico de afinidad de proteína A y un proceso cromatográfico de intercambio aniónico.
- 40 8. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que un aminoácido incluido como un ingrediente de una disolución amortiguadora o una parte de la misma que se utiliza en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico es un aminoácido seleccionado de entre ácido glutámico, histidina y glutamina.
- 45 9. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se añade una sal a una muestra que contiene proteínas que se carga en la cromatografía de afinidad de proteína A en el proceso cromatográfico de afinidad de proteína A.
- 50 10. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que una proporción de proteínas de célula hospedadora en el producto de purificación tras completar el proceso cromatográfico de intercambio catiónico es inferior a 100 ng/mg.
- 55 11. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que una proporción de polímeros en el producto de purificación tras completar el proceso cromatográfico de intercambio catiónico es inferior a 1,5%.
12. Procedimiento para purificar una proteína para reducir la cantidad de polímeros y de proteínas de célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que un aminoácido incluido en una formulación farmacéutica de una especialidad farmacéutica que comprende la proteína purificada mediante el procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 como un principio activo es idéntico a un aminoácido incluido como un ingrediente de la disolución amortiguadora o de una parte de la misma que se utiliza en el proceso cromatográfico de intercambio catiónico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

FIG.1

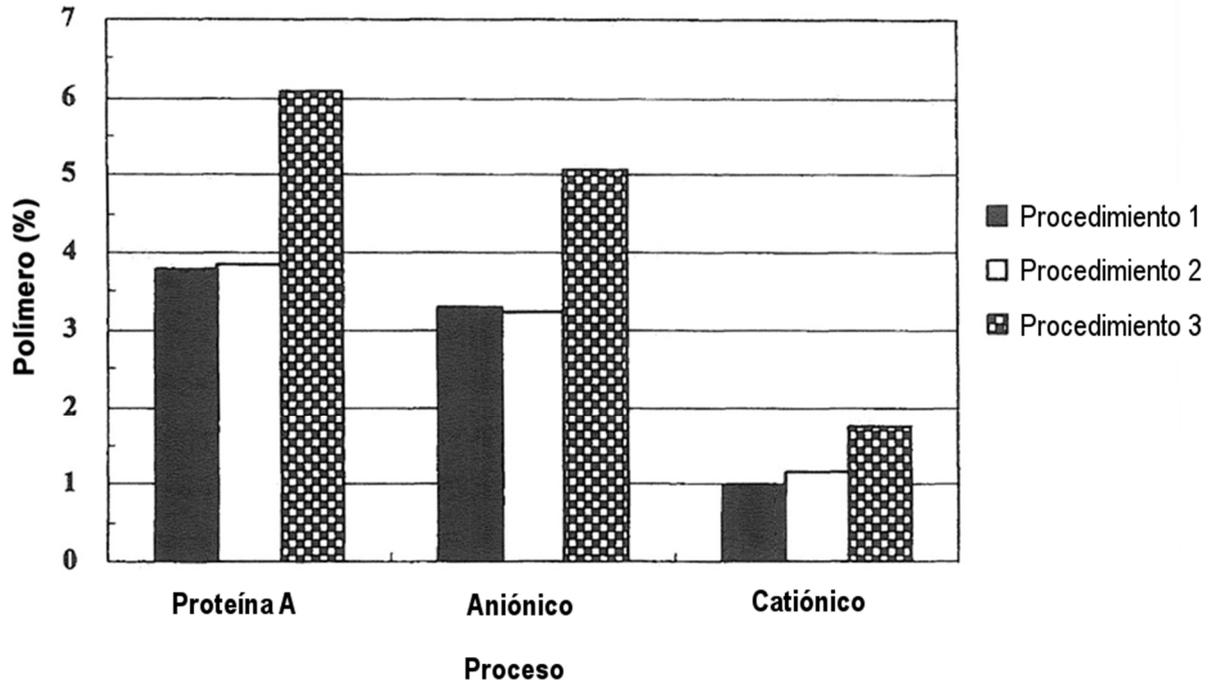


FIG.2

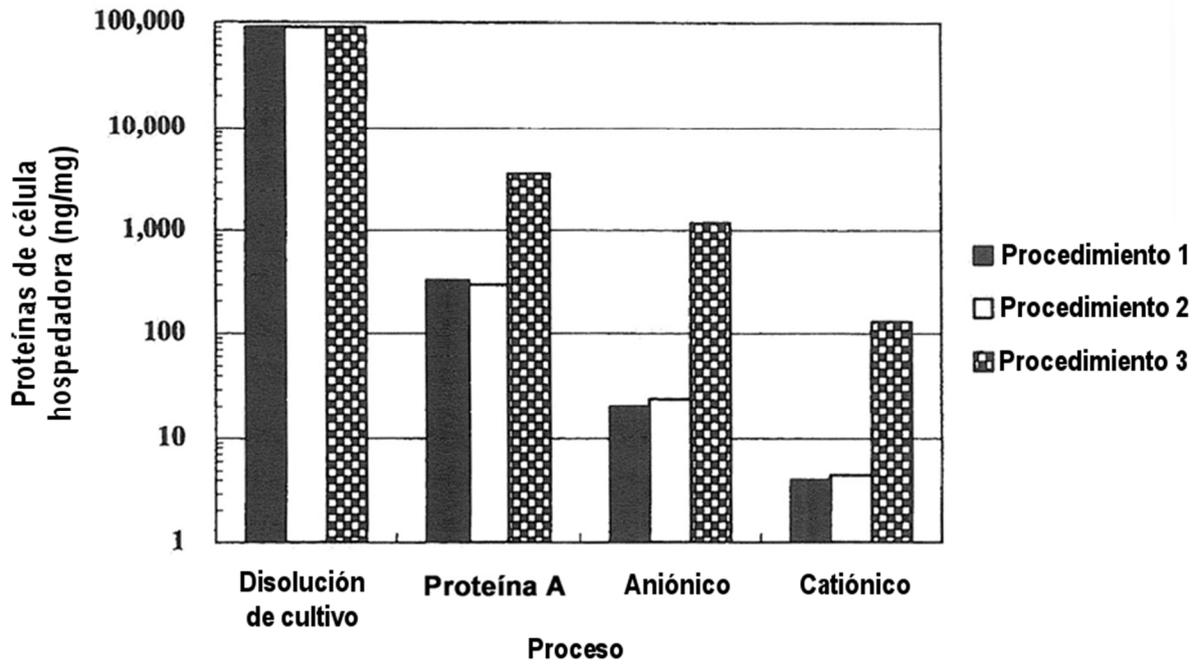


FIG.3

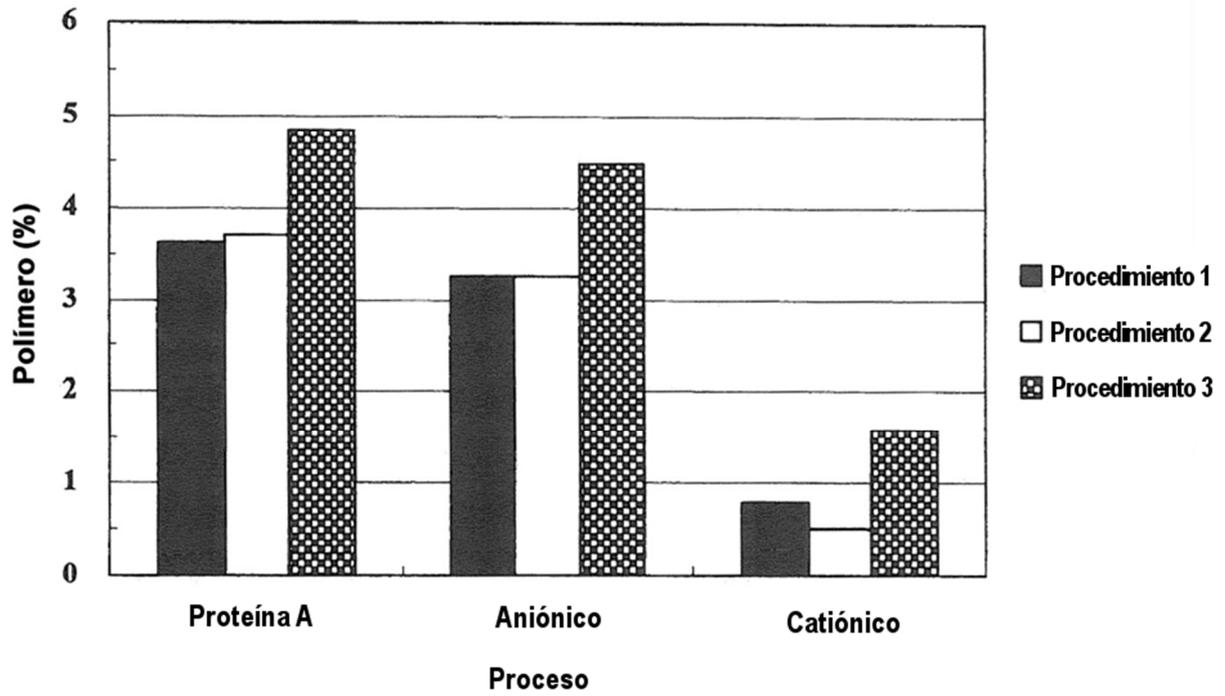


FIG.4

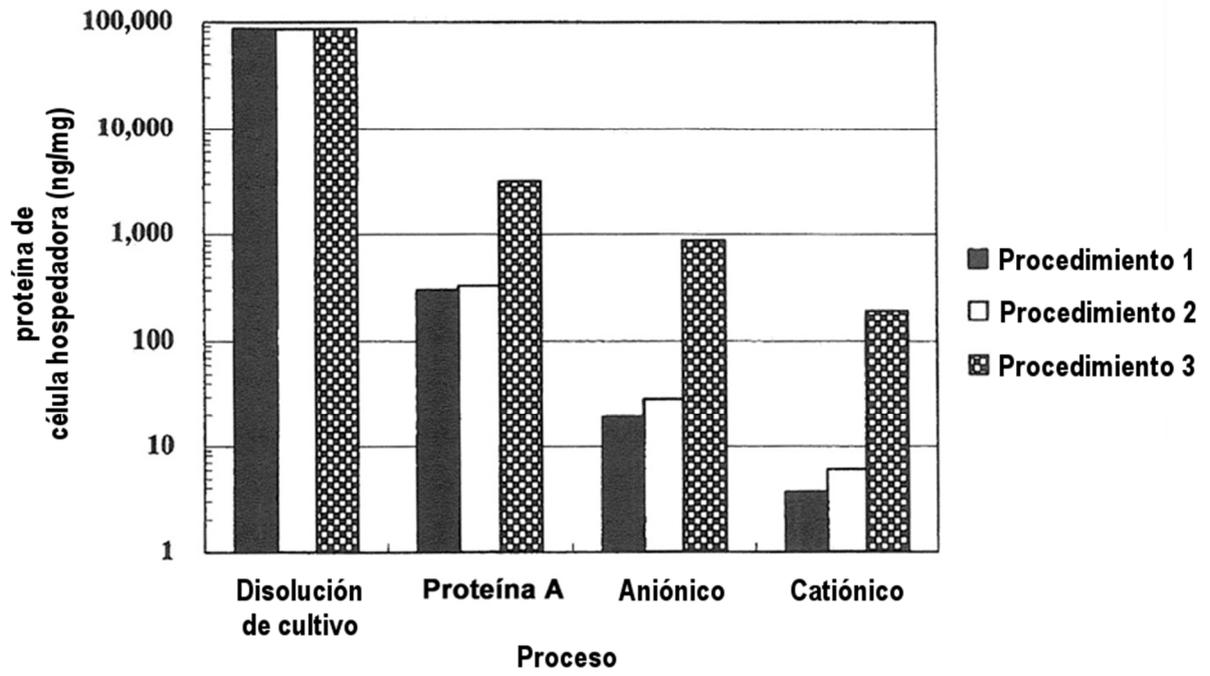
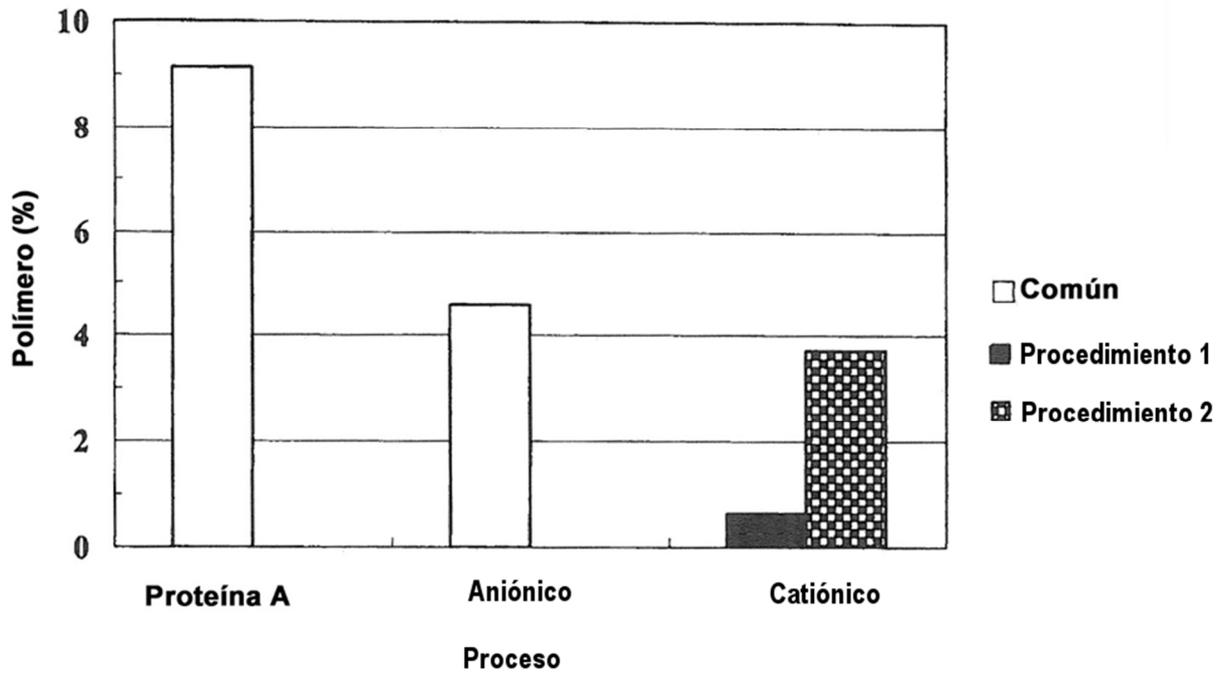


FIG.5



**FIG.6**

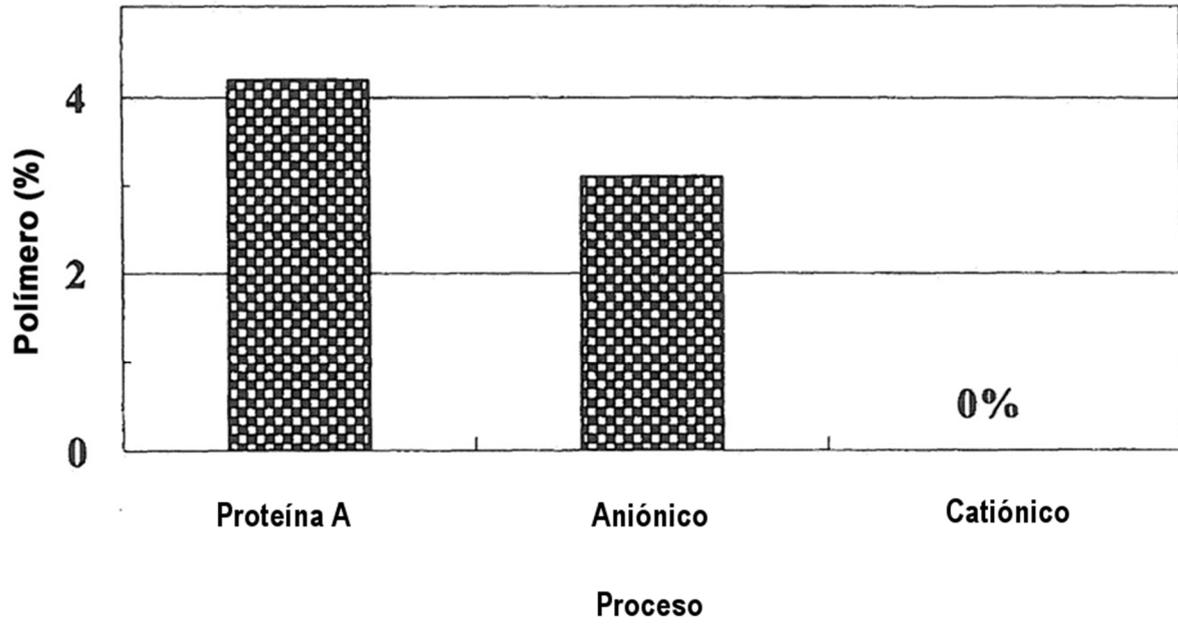


FIG.7

