

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 650**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

B01D 15/26 (2006.01)

B01J 20/282 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 15159525 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2942353**

54 Título: **Métodos para reducir el nivel de una o más impurezas en una muestra durante la purificación de proteínas**

30 Prioridad:

19.08.2011 US 201161575349 P

29.06.2012 US 201261666240 P

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

06.08.2018

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)

400 Summit Drive

Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:

BIAN, NANYING;

GILLESPIE, CHRISTOPHER;

STONE, MATTHEW;

KOZLOV, MIKHAIL;

CHEN, JIE y

SIWAK, MARTIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 677 650 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

Métodos para reducir el nivel de una o más impurezas en una muestra durante la purificación de proteínas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de cromatografía mejorados y métodos para reducir el nivel de una o más impurezas durante la purificación de proteínas.

Antecedentes

La cromatografía es una técnica de purificación dominante en la purificación de materiales biológicos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

10 Los métodos de cromatografía usados comúnmente incluyen uno o más de medios de cromatografía de afinidad, medios de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, de interacción hidrofílica, de modo mixto y de exclusión de tamaños (*es decir*, combinación de diversas interacciones de cromatografía). Por ejemplo, para la purificación de anticuerpos monoclonales, un proceso de purificación típico incluye una etapa de captura de afinidad de Proteína A inicial seguida de una o más etapas de pulido de intercambio, cuyo propósito es reducir el nivel de una o más impurezas tales como, por ejemplo, proteína celular huésped (HCP). Además, se pueden usar otras técnicas cromatográficas, tales como: cromatografía de interacción hidrofóbica de unir y eluir (HIC); cromatografía de interacción hidrofóbica de flujo pasante (FTHIC); cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante (AEX); cromatografía de partición débil con intercambio catiónico, intercambio aniónico o resinas de interacción hidrofóbica; técnicas de cromatografía de modo mixto, por ejemplo, *intercambio aniónico y catiónico débil de unir y eluir*, interacción de intercambio iónico e hidrofóbico de unir y eluir e interacción de modo mixto de intercambio iónico e hidrofóbico de flujo pasante (FTMM), las cuales pueden utilizar resinas tales como Capto™ Adhere, Capto™ MMC, HEA Hypercel™, PPA Hypercel™. Adicionalmente, para el pulido se puede usar la cromatografía de inducción de carga hidrofóbica (HCI) junto con otras y combinaciones de diversas técnicas.

25 Aunque la cromatografía ofrece muchas ventajas para la purificación de proteínas a una escala menor, a una escala mayor, el relleno de columnas de cromatografía es trabajoso y requiere tiempo, además de caro. Además, el ensuciamiento de las columnas de cromatografía es un problema común, dando como resultado que el usuario tiene que desechar columnas, lo que es indeseable, especialmente debido al elevado coste de las resinas de cromatografía.

30 Recientemente, ha habido una tendencia notable en la industria para tratar de reducir el número de etapas en los procesos de purificación de proteínas. También, es una tendencia creciente en la industria el uso de técnicas para la obtención de un título de expresión más alto usando biorreactores. La combinación de estas dos tendencias ha dado lugar a que se carga en una columna más producto, lo que da como resultado una carga aumentada de medios de cromatografía bastante caros así como una menor pureza del producto, ambos de los cuales son indeseables.

Compendio de la invención

35 La presente invención describe procesos de purificación de proteínas según el presente juego de reivindicaciones. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que ciertos materiales (por ejemplo, material carbonoso tal como carbón activado) se pueden incorporar en los procesos de purificación de proteínas basadas en columna de cromatografía en un modo de flujo pasante, lo que resulta en la reducción de la carga de las columnas de cromatografía, y por consiguiente el aumento de la vida útil de las columnas de cromatografía.

40 Además, la presente invención se basa en el descubrimiento e inesperado de que los materiales carbonosos (*por ejemplo*, carbón activado) se pueden usar bien corriente arriba o corriente abajo de una etapa de cromatografía de captura para reducir el nivel de una o más impurezas. En algunas realizaciones según los métodos reivindicados, se pone en contacto una muestra con un material carbonoso antes de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX). También se describe, en donde se usa una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) antes de poner en contacto una muestra con un material carbonoso. En aún otras realizaciones, se pone en contacto una muestra con un material carbonoso después de la etapa de captura de afinidad de Proteína A. Alternativamente, la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A se puede usar después de poner en contacto la muestra con un material carbonoso. La etapa de captura de afinidad de Proteína A puede estar seguida de una etapa de cromatografía de flujo pasante de intercambio aniónico (AEX) y con o sin una etapa de unión/elución de cromatografía CEX. Aún en otras realizaciones, el material carbonoso se puede usar después de una etapa de captura de no afinidad (*por ejemplo*, usando cromatografía de unir y eluir CEX como una etapa de captura) y está seguido de una etapa de cromatografía AEX.

Además, la presente invención proporciona procesos de purificación de proteínas basados en cromatografía que incluyen menos etapas que los procesos convencionales.

55 En un aspecto según la presente invención, se proporciona un método para reducir la carga de una o más columnas

5 cromatográficas. En algunas realizaciones, tal método comprende poner en contacto una muestra que comprende una proteína de interés y una o más impurezas en un modo de flujo pasante con uno de: (i) un material carbonoso; (ii) una combinación de un material carbonoso y medios CEX; (iii) una combinación de un material carbonoso y medios AEX; (iv) una combinación de un material carbonoso y medios de modo mixto; (v) una combinación de un material carbonoso y medios HIC, y (vi) una combinación de un material carbonoso y medios CEX, AEX y de modo mixto, antes de poner en contacto la muestra con uno o más columnas cromatográficas que contienen medios de afinidad, medios AEX, medios CEX, medios HIC o medios en modo-mixto, para reducir de ese modo la carga de una o más columnas cromatográficas.

10 En otro aspecto según los métodos reivindicados, se proporciona un método para reducir el nivel de una o más impurezas en una muestra que contiene una proteína de interés y la una o más impurezas de interés, en donde el método comprende las etapas de: (i) poner en contacto una muestra que comprende una proteína de interés y una o más impurezas con una o más columnas de cromatografía que contienen medios de afinidad, medios AEX, medios CEX, medios HIC o medios de modo mixto, en condiciones tales que la proteína de interés se une a la columna; (ii) obtener un primer eluato de la muestra; (iii) poner en contacto el primer eluato en modo de flujo pasante con uno de: (a) un material carbonoso; y (b) una combinación de un material carbonoso y uno o más de medios CEX, medios AEX, medios de modo mixto y medios HIC; y (iv) obtener un segundo eluato de la muestra; donde el segundo eluato comprende un nivel menor o reducido de una o más impurezas con relación al nivel de una o más impurezas en el primer eluato.

20 Aún en otro aspecto, se proporciona un método para reducir el nivel de una o más impurezas en una muestra que comprende una proteína de interés y una o más impurezas, comprendiendo el método las etapas de: (i) poner en contacto una muestra que comprende una proteína de interés y una o más impurezas con una columna de cromatografía que contiene medios de afinidad; (ii) obtener un primer eluato de la muestra; (iii) poner en contacto el primer eluato en modo de flujo pasante con un material carbonoso; (iv) obtener un segundo eluato de la muestra; (v) poner en contacto el segundo eluato con medios de cromatografía de intercambio aniónico; y (vi) obtener un tercer eluato de la muestra, en donde el tercer eluato comprende un nivel menor o reducido de una o más impurezas con relación al nivel de una o más impurezas con relación al nivel de una o más impurezas cuando el primer eluato con está en contacto con el material carbonoso.

30 Se describe un método que incluye una etapa de cromatografía de unir y eluir CEX después de la etapa de captura de afinidad y antes de poner en contacto la muestra con medios cromatográficos de intercambio aniónico, lo que en algunas realizaciones es un adsorbente de membrana. En algunas realizaciones, un método según la invención reivindicada obvia la necesidad de etapas cromatográficas adicionales, por ejemplo, una etapa de cromatografía de unir y eluir CEX usada después de la etapa de captura de afinidad. Los medios cromatográficos de intercambio aniónico disponibles comercialmente ejemplares son adsorbentes de membrana tales como ChromaSorb™ (MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, EE.UU.), Mustang Q (PALL CORPORATION, Port Washington, NY, EE.UU.), Sartobind Q (SARTORIUS STEDIM, Alemania), así como medios de lecho tales como Q Sepharose FF (GE HEALTHCARE, Filadelfia, PA, EE.UU.).

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos según la invención reivindicada que emplean etapas cromatográficas no basadas en columnas.

40 Aún en otro aspecto, se proporciona un método para reducir el nivel de una o más impurezas en una muestra que comprende una proteína de interés, comprendiendo el método las etapas de: (i) obtener una fase proteica que comprende la proteína de interés; (ii) reconstituir la fase proteica que comprende la proteína de interés usando un tampón adecuado, para obtener así una disolución proteica reconstituida; (iii) poner en contacto la disolución proteica reconstituida con un material carbonoso en modo de flujo pasante; (iv) obtener un primer eluato que comprende la proteína de interés; (v) poner en contacto el primer eluato con medios de cromatografía de intercambio aniónico; y (vi) obtener un segundo eluato que comprende la proteína de interés, en donde el segundo eluato comprende un nivel inferior o reducido de una o más impurezas con relación al nivel de una o más impurezas cuando la disolución proteica reconstituida de (iii) no se pone en contacto con el material carbonoso.

En algunas realizaciones, tal método obvia la necesidad de cualquier etapa cromatográfica de unir y eluir, por ejemplo, una etapa cromatográfica CEX o de afinidad de unir y eluir.

50 En algunos métodos según la presente invención, la fase proteica se obtiene usando uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en precipitación, floculación, cristalización, cromatografía en columna, uso de una molécula pequeña soluble, uso de un ligando polimérico, o uso de un medio cromatográfico suspendido.

55 En algunas realizaciones, la combinación de un material carbonoso y uno o más de medios AEX, medios CEX, medios HIC y medios mixtos implica mezclar el material carbonoso con uno o más de tales medios. En otras realizaciones, la combinación de un material carbonoso y uno o más de medios AEX, medios CEX, medios HIC y medios mixtos conlleva el uso de materiales diferentes en la combinación en tándem.

En diversas realizaciones según los métodos de la presente invención, los medios de afinidad se seleccionan de Proteína A o Proteína G.

En algunas realizaciones, la proteína de interés es un anticuerpo o una proteína que contiene una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

En algunas realizaciones, la muestra comprende una alimentación de cultivo celular.

- 5 En algunas realizaciones, la muestra es una alimentación de cultivo celular clarificado.

En algunas realizaciones, la alimentación de cultivo celular clarificado se obtiene mediante filtración y/o centrifugado profundo.

En algunas realizaciones, el cultivo celular clarificado se obtiene mediante precipitación con una sal, un ácido, un polímero, o un polímero sensible a estímulos.

- 10 En diversas realizaciones, el material carbonoso usado en los métodos según la invención reivindicada es carbón activado. En algunas realizaciones, el carbón activado comprende carbón vegetal activado.

En algunas realizaciones, la combinación de un material carbonoso y uno o más de medio CEX, medios AEX, medios de modo mixto y medios HIC comprende una mezcla de carbón activado y uno o más de resina CEX, resina AEX, resina de modo mixto y resina HIC. En algunas realizaciones, tal mezcla se rellena en una columna cromatográfica. En otras realizaciones, la mezcla se rellena en un disco. Aún en otras realizaciones, la mezcla se rellena en una vaina, cartucho o cápsula.

- 15

En algunas realizaciones, el carbón activado se rellena en una columna de cromatografía. En otras realizaciones, el carbón activado se rellena en un dispositivo sellado desechable tal como Millistak+® Pod. Aún en otras realizaciones, el carbón activado se rellena es un cartucho o una cápsula.

- 20 En algunas realizaciones, el carbón activado se impregna en un material poroso, por ejemplo, el carbón activado se incorpora en medios fibrosos porosos. El material poroso puede estar contenido en una columna, un disco, un Millistak+® Pod, un cartucho o una cápsula. En algunas realizaciones, el carbón activado se rellena en un medio celulósico.

- 25 En una realización particular, el medio AEX es una membrana que tiene un revestimiento superficial que comprende una o más aminas primarias poliméricas o copolímeros de las mismas.

En algunas realizaciones, una muestra que comprende una proteína de interés y una o más impurezas se pone en contacto con carbón activado antes de someter la muestra a una etapa de captura de afinidad. En otras realizaciones, la muestra se pone en contacto con carbón activado después de la etapa de captura de afinidad.

- 30 En diversos métodos según la invención reivindicada, la pérdida de rendimiento de la proteína de interés usando un proceso que emplea carbón activado es menor que 20% de la cantidad de proteína total. En otras palabras, los procesos según la invención reivindicada dan como resultado un rendimiento del 80% o mayor de proteína de interés, donde 100% es la cantidad de proteína total. En una realización adicional, la pérdida de rendimiento de la proteína de interés usando un proceso que emplea carbón activado es menor que 10%. En otras palabras, los procesos según la invención reivindicada dan como resultado un rendimiento del 90% o mayor de proteína de interés, donde 100% es la cantidad de proteína total.

- 35

En una realización particular, el carbón activado se usa como parte de una operación unitaria o etapa de un proceso de purificación de flujo pasante en un método para purificar una molécula diana (por ejemplo, un anticuerpo o una proteína que contiene una región Fc) a partir de una muestra (por ejemplo, un eluato tal como un eluato de Proteína A recuperado de una etapa de un proceso cromatográfico de unir y eluir realizada antes de la etapa de purificación de flujo pasante). En tal operación unitaria o etapa de un proceso de purificación de flujo pasante, el eluato a partir de una etapa cromatográfica de unir y eluir (por ejemplo, una columna de afinidad de Proteína A) fluye a través de carbón activado seguido de un medio AEX seguido de un medio CEX y seguido de un filtro de virus, como se representa en la Figura 19. En algunas realizaciones, se realiza un cambio en la disolución (por ejemplo, un cambio de pH) entre la etapa AEX y la etapa CEX, donde la disolución emplea un tanque de compensación y/o un mezclador estático en línea. En algunas realizaciones, la operación unitaria o etapa del proceso de purificación de flujo pasante que emplea carbón activado, como se describe en la presente memoria, es parte de un proceso continuo para purificar una molécula diana, en donde la etapa de purificación de flujo pasante está en comunicación de fluidos con una etapa del proceso corriente arriba (por ejemplo, una etapa de captura cromatográfica de unir y eluir y una etapa de proceso corriente abajo (por ejemplo, una etapa de formulación) de la etapa de proceso de purificación de flujo pasante, permitiendo así que la muestra líquida fluya a través del proceso de forma continua.

- 40

- 45

- 50

En una realización particular, la operación unitaria o etapa de proceso de flujo pasante entera emplea una plataforma única (es decir, un equipamiento de control/monitorización).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir el

rendimiento IgG en un eluato de flujo pasante de una alimentación CHO-S nulas con IgG policlonal añadida para cada uno de los medios adsorbentes comercialmente disponibles que se evaluaron, es decir, carbón activado (AC); una resina de intercambio catiónico de agarosa, SP Sepharose™ Fastflow (SPFF); una resina de intercambio catiónico polimérica, ProRes™-S; una resina de intercambio aniónico de agarosa, Q Sepharose™ (QFF); y una resina HIC de agarosa, Phenyl Sepharose™ 6 Fastflow (ph FF). Como se muestra en la Figura 1, excepto para la resina HIC que muestra hasta ~5% de pérdida de rendimiento IgG, todos los demás medios evaluados no mostraron pérdidas detectables.

La Figura 2 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir la cantidad de especies activas a UV 280 nm en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida, para cada uno de los diversos medios adsorbentes comercialmente disponibles que fueron evaluados, es decir, un carbón activado, Nuchar® RGC, (AC), SPFF, ProRes™-S, QFF y ph FF, así como la alimentación clarificada sin tratar. Como se muestra en la Figura 2, el carbón activado redujo significativamente la cantidad de especies de color en comparación a los otros medios adsorbentes.

La Figura 3 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de proteína celular hospedante (HCP) en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida, para cada uno de los medios adsorbentes comercialmente disponibles listados anteriormente, así como alimentación clarificada sin tratar. La concentración HCP se midió en ng/mL usando un kit Cygnus CHO-CM HCP ELISA. Como se muestra en la Figura 3, todos los medios evaluados, que incluían carbón activado, eliminaron HCP en alguna medida. Sin embargo, las resinas catiónicas SPFF y ProRes™-S, eliminaron HCP de la forma más eficaz.

La Figura 4 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de ADN en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida, para cada uno de los medios listados anteriormente, así como la alimentación clarificada sin tratar. La concentración de ADN (µg/mL) se midió usando un ensayo PicoGreen. Como se muestra en la Figura 4, cada uno de los medios elimina ADN en alguna medida. Sin embargo, el medio de intercambio aniónico elimina el ADN de la forma más eficaz, seguido del carbón activado.

La Figura 5 representa un diagrama de dispersión x-y que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de IgG en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida y ADN de esperma de arenque, para cada uno de los medios evaluados listados anteriormente, a cada 10 CV de alimentación cargada, hasta 100 CV, incluyendo la alimentación clarificada sin tratar. El volumen de columna (CV) se muestra en el eje x y la concentración IgG en mg/mL se muestra en el eje y. Todos los medios evaluados, que incluían AC, SPFF, ProRes™-S y QFF, no mostraron una pérdida de IgG significativa hasta una carga de 100 CV de alimentación clarificada sin tratar.

La Figura 6 representa un diagrama de dispersión x-y que muestra los resultados de un experimento para medir el área del pico de la especie activas UV (que corresponde a la cantidad de especies activas UV) en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nula con IgG policlonal añadida y DNA de esperma de arenque, para cada uno de los medios evaluados, a cada 10 CV de alimentación cargada, hasta 100 CV, que incluía la alimentación clarificada sin tratar. El volumen de columna (CV) se muestra en el eje x y el área del pico de la especie activa UV en el flujo pasante de la columna analítica de Proteína A se muestra en el eje y. De todos los materiales evaluados, AC eliminó más del 70% de la especie activa UV a través de los 100 CV; QFF eliminó aproximadamente 10% de la especie activa UV a través de los 100 CV; y las dos resinas de intercambio catiónico, SPFF y ProRes™-S eliminaron una cantidad mínima de especie activa UV.

La Figura 7 representa un diagrama de dispersión x-y que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de proteína celular hospedante (HCP) en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida y ADN de esperma de arenque, para cada uno de los medios evaluados listados anteriormente, a cada 10 CV de alimentación cargada, hasta 100 CV, incluyendo la alimentación clarificada sin tratar. El volumen de columna (CV) se muestra en el eje x y la concentración HCP en ng/mL se muestra en el eje y. SPFF y ProRes S eliminaron el máximo HCP a través de los 100 CV. QFF eliminó algo de HCP pero se rompió rápidamente. Para esta alimentación específica que tenía una concentración elevada de ADN, el carbón activado eliminó la última cantidad de HCP.

La Figura 8 representa un diagrama de dispersión x-y que muestra el resultado de un experimento para medir la concentración de ADN en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadida y ADN de esperma de arenque, para cada uno de los medios evaluados y listados anteriormente, a cada 10 CV de alimentación cargada, hasta 100 CV, incluyendo la alimentación clarificada sin tratar. El volumen de columna (CV) se muestra en el eje x y la concentración de ADN en µg/mL se muestra en el eje y. Cada uno de los medios evaluados, que incluían AC, SPFF, ProRes™-S y QFF, eliminaron el ADN a través de los 100 CV, son embargo, a grados diferentes.

La Figura 9 es un esquema de los diferentes modos de operación ejemplares que se pueden usar para la eliminación de impurezas. El diagrama de flujos de la derecha representa un experimento representativo donde la

alimentación clarificada sin tratar se carga en una columna que contiene AC, seguido de una columna que contiene medios SPFF, ProRes™-S o QFF. El diagrama de flujos del medio representa un experimento representativo donde la alimentación clarificada sin tratar se carga en una columna que contiene AC, seguido de una columna que contiene medios SPFF o ProRes™-S y después seguido de QFF. El diagrama de flujos de la derecha representa un experimento representativo donde la carga clarificada sin tratar se carga en una columna que contiene una mezcla 1:1 (v/v) de AC y SPFF; o una mezcla 1:1 (v/v) de AC y ProRes™-S; o una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de AC y ProRes™-S y QFF.

La Figura 10 representa un diagrama de barras que muestra el área del pico de la especie activa UV (que corresponde a la cantidad de especie activa UV) en un eluato de flujo continuo de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido, para cada una de las combinaciones de materiales mostrada en la Figura 9, que incluye la alimentación clarificada sin tratar. El carbón activado y las mezclas que contienen carbón activado redujeron significativamente la especie activa UV. En los casos donde se usaban tanto el carbón activado como la resina de intercambio aniónico en un proceso, bien usado secuencialmente o como una mezcla, se eliminaron más especies activas UV, demostrando un efecto sinérgico de los diferentes materiales.

La Figura 11 representa un diagrama de barras que muestra la concentración de proteína celular hospedante (HCP) en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido, para cada una de las combinaciones de materiales mostrada en la Figura 9, que incluían alimentación clarificada sin tratar. Todos los materiales eliminaron HCP en alguna extensión; sin embargo, cuando se usa carbón activado en un proceso junto con una resina catiónica, tal como SPFF o ProRes™-S, o con una resina aniónica, tal como, QFF, bien cuando se usa secuencialmente con una resina o como una mezcla con una resina, eliminaba HCP de la manera más eficaz, indicando un efecto sinérgico de los materiales diferentes.

La Figura 12 representa un diagrama de barras que muestra la concentración de ADN en un eluato de flujo pasante de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido, para cada una de las combinaciones de materiales mostrada en la Figura 9, que incluían alimentación clarificada sin tratar. Todos los materiales eliminaron HCP ADN en alguna extensión; sin embargo, cuando se usó carbón activado bien secuencialmente con QFF o como una mezcla con QFF, fue lo más efectivo en la eliminación de ADN en comparación con los otros materiales y combinaciones evaluados.

La Figura 13 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir el rendimiento IgG en un eluato de flujo pasante de un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A para cada uno de los materiales evaluados, es decir, AC; SPFF; QFF; ph FF, así como dos combinaciones de materiales, una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de AC/SPFF/QFF, y una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de PhFF/SPFF/QFF. La alimentación para el eluato de flujo pasante de los diferentes materiales evaluados era un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A generado usando resina de Proteína A Prosep Ultra Plus a partir de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido. Todos los materiales evaluados mostraban más del 80% de rendimiento.

La Figura 14 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de proteína celular hospedante (HCP) en un eluato de flujo pasante de un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A para cada uno de los materiales evaluados, es decir, AC; SPFF; QFF; ph FF, así como dos combinaciones de materiales, una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de AC/SPFF/QFF, y una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de PhFF/SPFF/QFF. La alimentación para el eluato de flujo pasante de los diferentes materiales evaluados era un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A generado usando resina de Proteína A Prosep Ultra Plus a partir de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido. Todos los materiales o mezclas de materiales eliminaron cierta cantidad de HCP a partir del conjunto de fracciones de elución de Proteína A; sin embargo, el carbón activado y la resina de intercambio catiónico eran los más eficaces, cuando se usaban solos. Cuando se usaron como una mezcla, AC/SPFF/QFF y PhFF/SPFF/QFF eliminaron más HCP que cualquier componente individual solo. QFF y PhFF, cuando se usaron solos, eliminaron la última cantidad de HCP.

La Figura 15 representa un diagrama de barras que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de ADN en un eluato de flujo pasante de un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A para cada uno de los materiales evaluados, es decir, AC; SPFF; QFF; y ph FF, así como dos combinaciones de materiales, una mezcla 1:1:1 de AC/SPFF/QFF y una mezcla 1:1:1 de PhFF/SPFF/QFF. La alimentación para el eluato de flujo pasante de los diferentes materiales evaluados era un conjunto de fracciones de elución de columna de Proteína A generado usando resina de Proteína A Prosep Ultra Plus a partir de una alimentación de CHO-S nulas con IgG policlonal añadido. Todos los materiales o mezclas de materiales eliminaron cierta cantidad de ADN del conjunto de fracciones de elución de Proteína A con las mezclas de resinas AC/SPFF/QFF y PhFF/SPFF/QFF mostrando ligera ventaja sobre cualquier componente individual.

La Figura 16 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de HCP con relación a la del producto (es decir, un anticuerpo monoclonal) en ppm para las fracciones individuales de una disolución de anticuerpo monoclonal, donde la disolución se capturó a partir de un cultivo celular clarificado usando cromatografía de Proteína A (referida como eluato de Proteína A) y se sometió posteriormente a tres trenes de purificación de flujo pasante separados. El primer tren empleaba un dispositivo de membrana de intercambio

aniónico ChromaSorb™ de 0,2 mL compuesto de 5 capas; el segundo tren empleaba una columna de relleno de 1 mL de carbón activado HD Nuchar; y le tercer tren empleaba una columna de carbón activado de 1 mL seguido de una membrana de intercambio aniónico ChromaSorb™ de 0,2 mL. Se recogieron fracciones de 10 mL del eluato de cada tren de purificación y se analizaron las fracciones seleccionadas para determinar la concentración de proteína celular hospedante (HCP) e IgG. El eje X del gráfico representa el punto final de recogida para la fracción de 10 mL en volúmenes de columna (CV) del eluato de la columna de carbón activado. El eje Y del gráfico representa la concentración de HCP con relación a la del producto (*es decir*, un anticuerpo monoclonal) en ppm para las fracciones individuales del eluato de carbón activado. El gráfico muestra que el tratamiento de flujo pasante del eluato capturado por afinidad con carbón activado solo y en combinación con medios de intercambio aniónico era inesperadamente efectivo para la eliminación de impurezas de la disolución del anticuerpo monoclonal.

La Figura 17 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de HCP con relación a la del producto (*es decir*, un anticuerpo monoclonal) en ppm para las fracciones individuales de una disolución de anticuerpo monoclonal, donde la disolución se capturó a partir de un cultivo celular clarificado usando cromatografía de intercambio catiónico (CEX) (referido como eluato CEX) y se sometió posteriormente a purificación con una columna de relleno de 1 mL de carbón activado HD Nuchar. Se recogieron siete fracciones de 10 mL del eluato, que se analizaron para determinar la concentración de proteína celular hospedante (HCP) e IgG. El eje X del gráfico representa el punto final de recogida para la fracción de 10 mL en volúmenes de eluato (mL) del eluato de la columna de carbón activado. El eje Y del gráfico representa la concentración de HCP con relación a la del producto (*es decir*, un anticuerpo monoclonal) en ppm para las fracciones individuales. El gráfico muestra que se puede usar carbón activado para eliminar impurezas de una variedad de diferentes disoluciones proteicas.

La Figura 18 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento para medir la concentración de HCP con relación a la del producto (*es decir*, un anticuerpo monoclonal, MAb II) en ppm para las fracciones individuales de una disolución de anticuerpo monoclonal, donde la disolución es capturada a partir de un cultivo celular clarificado usando un sistema cromatográfico de multi-cromatografía continuo de tres columnas (CMC) equipado con columnas de Proteína A, y posteriormente purificado con carbón activado HD Nuchar relleno en una columna seguido de un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, ChromaSorb™). El eje X del gráfico representa el punto final de la recogida de fracciones, medido en el pedo de anticuerpo cargado por unidad de volumen del dispositivo de intercambio aniónico (kg/L). El eje Y del gráfico representa la concentración de HCP con relación a la del producto (*es decir*, un anticuerpo monoclonal) en ppm para las fracciones individuales. El gráfico muestra que mientras que tanto el carbón activado como ChromaSorb™ eliminan una parte significativa de HCP cuando se usan solos, cuando se usan en combinación, aumentan la pureza de la disolución de partida de 1,370 ppm HCP a por debajo de 10 ppm.

La Figura 19 muestra un esquema de la etapa conectada del proceso de purificación de flujo pasante, como se describe en la presente memoria. un dispositivo que contiene carbón activado se conecta directamente a un dispositivo de intercambio aniónico. El efluente del dispositivo de intercambio aniónico pasa a través de un mezclador estático, donde se añade un ácido acuoso para reducir el pH, y después va a través de un dispositivo de flujo pasante de intercambio catiónico y un filtro de virus.

La Figura 20 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir el punto final HCP después del dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (*es decir*, ChromaSorb™). El eje Y se refiere a la concentración HCP (ppm) y el eje X se refiere a la carga AEX (kg/L).

La Figura 21 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento para medir la eliminación de agregados MAb como una función de la carga del dispositivo de filtración de virus en la etapa del proceso de purificación de flujo pasante. El eje X se refiere a la carga de filtración de virus (kg/m²) y el eje Y se refiere al porcentaje de agregados MAb en la muestra después de la filtración de virus.

La Figura 22 es un gráfico que representa los resultados de un experimento para medir los perfiles de presión después de la filtración profunda, el carbón activado y la filtración de virus. El eje Y se refiere a la presión (psi) y el eje X se refiere al tiempo en horas.

Descripción detallada

La presente invención proporciona procesos nuevos y mejorados para purificar una proteína de interés a partir de una muestra que contiene la proteína de interés y una o más impurezas.

El carbón activado se ha usado previamente en los procesos de purificación de agua. Además, el carbón activado se ha usado para eliminar pequeñas moléculas de impurezas, tales como ácidos grasos y bilirrubina, de suero de albúmina (véase, *por ejemplo*, Chen et al., J. Biol. Chem., 242: 173-181 (1967); Nakano et al., Anal Biochem., 129: 64-71 (1983); Nikolaev et al., Int. J. Art. Org., 14:179-185 (1991)). El carbón activado también se ha usado para eliminar pigmentos, así como proteínas hospedantes, proteasas y ribonucleasas durante la purificación de virus de plantas (véase, *por ejemplo*, Price, Am. J. Botany, 33: 45-54 (1946); Corbett, Virology, 15:8-15 (1961); McLeana et al., Virology, 31: 585-591 (1967)).

De acuerdo con esto, en general, se ha informado que el carbón activado se une de forma no específica a moléculas

en disolución (*por ejemplo*, impurezas en una muestra de agua).

La presente invención está basada, al menos en parte, en el hallazgo sorprendente e inesperado de que el carbón activado puede eliminar de forma selectiva poblaciones de impurezas proteicas y ADN, haciéndolo por tanto útil en la purificación de proteínas producidas mediante la expresión recombinante en células.

- 5 Como se demuestra en los ejemplos en la presente memoria, el carbón activado se puede usar para la eliminación selectiva de impurezas de proteínas de células hospedantes (HCP) y ADN durante los procesos de purificación de proteínas sin afectar de forma significativa al rendimiento de la proteína diana. Además como se demuestra en los Ejemplos indicados en la presente memoria, cuando se usa carbón activado en un proceso de purificación de proteínas en un modo de flujo pasante, bien solo o en mezcla con uno o más medios de cromatografía de diversos tipos, ello resulta en una reducción significativa del nivel de una o más impurezas en la muestra que contiene proteínas así como en la reducción de la carga de columnas de cromatografía corriente abajo. Además, en algunos casos, el carbón activado disminuye el número de etapas que se pueden usar en un proceso de purificación, reduciendo por lo tanto el coste global de operación y ahorrando tiempo. Además, como se muestra en los Ejemplos indicados en la presente memoria, el carbón activado se puede usar antes o después de la etapa de captura, reduciendo así el nivel de una o más impurezas en una muestra que contiene la proteína de interés.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el carbón activado se usa en una etapa de purificación de flujo pasante de un proceso global para purificar una molécula diana, donde el proceso global así como la etapa de purificación de flujo pasante se realizan de forma continua.

- 20 Para que la presente descripción se pueda entender más fácilmente, primero se definen algunos términos. A través de la descripción detallada se indican definiciones adicionales.

I. Definiciones

- 25 El término "material carbonoso," como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia compuesta de carbono o que contiene carbono. En algunas realizaciones, el material carbonoso usado en los métodos según la invención reivindicada es carbón activado. En algunas realizaciones, el carbón activado comprende carbón vegetal activado. En algunas realizaciones, el carbón activado se incorpora en un medio celulósico.

- 30 El término "carbón activo" o "carbón activado," como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere a un material carbonoso que se ha sometido a un proceso para mejorar su estructura porosa. Los carbonos activados son sólidos porosos con áreas superficiales muy elevadas. Se pueden derivar de una variedad de fuentes que incluyen carbón, madera, cáscara de coco, cáscaras de frutos con cáscara y turba. El carbón activado se puede producir a partir de estos materiales usando activación física que implica calentar en una atmósfera controlada o activación química que utiliza ácidos fuertes, bases, u oxidantes. Los procesos de activación producen una estructura porosa con áreas superficiales muy elevadas que proporcionan carbón activado con alas capacidades para la eliminación de impurezas. Los procesos de activación se pueden modificar para controlar la acidez de la superficie.

- 35 Los procesos típicos de activación implican someter una fuente de carbono, tal como desechos de resina, carbón, carbón de coque, coque de petróleo, lignitos, materiales poliméricos y materiales lignocelulósicos que incluyen pulpa y papel, residuos de la producción de pulpa, madera (como virutas de madera, serrín, harina de madera), cáscaras de frutos con cáscara como cáscara de almendra y cáscara de coco), granos y semillas de frutas (como huesos de cereza y aceitunas) a un proceso térmico (*por ejemplo*, con un gas oxidante) o a un proceso químico (*por ejemplo*, con ácido fosfórico o sales metálicas tales como cloruro de zinc). Una activación química ejemplar de carbono masado en madera con ácido fosfórico (H₃PO₄) se describe en la patente de EE.UU. No. Re. 31.093, que daba como resultado en una mejora de las capacidades de adsorción de gas y decolorantes del carbono. También, la patente de EE.UU. No. 5.162.286 enseña la activación con ácido fosfórico de un material basado en madera que es particularmente denso y que tiene un contenido de lignina relativamente alto (30%), tal como cáscara de frutos con cáscara, huesos y granos. La activación con ácido fosfórico de material lignocelulósico también se discute en la Patente de EE.UU. No. 5.204.310, como una etapa para preparar carbonos de actividad elevada y densidad elevada.

- 50 En contraste a la mayoría de los otros materiales adsorbentes, se cree que el carbón activado interactúa con moléculas que usan fuerzas de van der Waals o de dispersión de London relativamente débiles. Los productos de carbón activado típicamente comerciales presentan un área superficial de al menos 300 m²/g, medido mediante el método Brunauer-Emmett-Teller ("BET") basado en la adsorción de nitrógeno, que es un método bien conocido en la técnica.

- 55 Aunque el carbón activo o activado se ha empleado previamente en procesos para purificar líquidos y gases, no se ha empleado previamente en procesos para purificar una proteína expresada recombinantemente a partir de una o más impurezas proteicas.

El término "inmunoglobulina," "Ig" o "IgG" o "anticuerpo" (usado de forma intercambiable en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura básica de cadena de cuatro polipéptidos que consiste en dos

5 cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intercadena, que tienen la habilidad de unirse al antígeno específicamente. El término "inmonoglobulina de cadena-sencilla," "o anticuerpo de cadena-sencilla" (usado de forma intercambiable en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consiste en una cadena ligera y una cadena pesada, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, mediante ligantes peptídicos intercadena, que tienen la habilidad de unirse al antígeno específicamente. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena ligera o pesada que comprende bucles peptídicos (*por ejemplo*, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por enlaces disulfuro intracadena y/o lámina β -plegada. Los dominios además son referidos en la presente memoria como "constantes" o "variables", basado en la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de clase en el caso de un dominio "variable". "Dominios" de anticuerpo o de polipéptido a menudo se refieren en la técnica de forma intercambiable como "regiones" de anticuerpo o de polipéptido. Los dominios "constantes" de cadenas ligeras de anticuerpo se refieren de forma intercambiable como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de cadenas pesadas de anticuerpo se refieren de forma intercambiable como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de cadenas ligeras de anticuerpo se refieren de forma intercambiable como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de cadenas pesadas de anticuerpo se refieren de forma intercambiable como "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

25 Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden también incluir anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que retengan, o se modifiquen para comprender, un dominio de unión específica a ligando. El término "fragmento" o "fragmento funcional" de un anticuerpo se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácido que una cadena de anticuerpo o anticuerpo completo o intacto. Los fragmentos se pueden obtener a través de tratamiento *químico* o enzimático de una cadena de anticuerpo o anticuerpo completo o intacto. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos se pueden expresar solos o como parte de una proteína más grande llamada una proteína de fusión. Fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv. Proteínas de fusión ejemplares incluyen proteínas de fusión Fc.

35 En una realización particular, los métodos de acuerdo con la invención reivindicada se usan para purificar un fragmento de un anticuerpo que es un fragmento que contiene una región Fc.

40 El término "región Fc" y "proteína que contiene una región Fc" significa que la proteína contiene regiones o dominios constantes de cadena ligera y/o pesada (regiones CH y CL como se han definido previamente) de una inmunoglobulina. Las proteínas que contienen una "región Fc" pueden poseer las funciones efectoras de un dominio constante de inmunoglobulina. Una "región Fc" tal como las regiones CH₂/CH₃, se pueden unir selectivamente a ligandos de afinidad tales como la Proteína A o variantes funcionales de la misma. En algunas realizaciones, una proteína que contiene una región Fc se une específicamente a la Proteína A o un derivado, variante o fragmento funcional de la misma. En otras realizaciones, una proteína que contiene una región Fc se une específicamente a la Proteína G o Proteína L, o derivados, variantes o fragmentos funcionales de la misma.

45 Como se ha discutido anteriormente, en algunas realizaciones, una proteína diana es una proteína que contiene una región Fc, *por ejemplo*, una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, una proteína que contiene una región Fc es una proteína recombinante que incluye la región Fc de una inmunoglobulina condensada a otro polipéptido o fragmento del mismo.

50 Generalmente, una inmunoglobulina o anticuerpo se dirige frente a un "antígeno" de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede aportar un beneficio terapéutico a ese mamífero.

55 El término " anticuerpo monoclonal " o "Mab," como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, *los anticuerpos* individuales en la población son idénticos excepto para las mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un sitio antigénico único. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante único sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usarse de acuerdo con la presente invención se pueden obtener por el método hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o se puede

obtener mediante métodos de ADN recombinante (véase, por *ejemplo*, la patente de EE.UU. No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

5 Los anticuerpos monoclonales además incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena ligera y/o pesada es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. No. 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

10 El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de una unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es *decir* los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (es *decir* los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los restos "marco" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se define en la presente memoria.

15 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de regiones hipervariables del receptor están reemplazados por restos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región de marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para mejorar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado 20 comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

25 Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico," usados en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen un ADN de una única hebra, de doble hebra o de triple hebra, ADN genómico, cADN, ARN, ADN-ARN híbrido, o un polímero que comprende las bases purina y pirimidina, u otras bases nucleótidas naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos fosfato o azúcares modificados o sustituidos. Además, se puede obtener un polinucleótido de doble hebra a partir del producto de síntesis química del polinucleótido de cadena sencilla bien sintetizando la hebra complementaria y reasociando las hebras en condiciones apropiadas, o mediante síntesis de la hebra complementaria de novo usando una ADN polimerasa *con un* cebador apropiado. Una molécula de ácido nucleico puede tomar diferentes formas, *por ejemplo*, un gen o fragmento de gen, uno o más exones, uno o más intrones, mARN, cADN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. A polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos ligantes tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. Como se usa en la presente memoria, "ADN" o "secuencia nucleótida" incluye no solo las bases A, T, C, y G, sino que también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleótidas tales como uniones no cargadas y tioatos, uso de análogos de azúcares y estructuras de esqueleto alternativas y/o modificadas, tales como poliamidas

30 El término "disolución," "composición" o "muestra," como se usa en la presente memoria, se refiere a una mezcla de una proteína de interés o proteína diana (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc tal como un anticuerpo) y una o más impurezas. En algunas realizaciones, la muestra se somete a una etapa de clarificación antes de someterse a los métodos según la invención reivindicada. En algunas realizaciones, la muestra comprende alimentación de cultivo celular, *por ejemplo*, alimentación de un cultivo celular mamífero (*por ejemplo*, células CHO). Sin embargo, las muestras también abarcan sistemas de expresión no mamíferos usados para producir una proteína de interés.

El término "sistemas de expresión no mamíferos" como se usa en la presente memoria se refiere a todas las células u organismos huésped empleados para generar proteínas terapéuticas, donde las células u organismos huésped son de origen no mamífero. Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión no mamíferos son *E. coli* y *Pichia pastoris*.

- 5 El término "especie activa UV" como se usa en la presente memoria, se refiere a la composición de la fracción de flujo pasante de un cultivo celular clarificado después de someter al cultivo a una columna analítica de Proteína A, monitorizado por un espectrómetro UV. En algunas realizaciones, el espectrofotómetro UV monitoriza la fracción a 280 nm. Esta fracción generalmente consiste en impurezas tales como tintes (tales como indicadores de pH), proteínas de células huésped, ADN y otros componentes de medios de cultivo celular que necesitan eliminarse de la fracción, que también contiene la proteína de interés (*por ejemplo*, un anticuerpo). El pico de impurezas de flujo pasante se integra manualmente o mediante un algoritmo predeterminado y se usa para cuantificar el nivel total de impurezas.

- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Los términos "proteína de interés" y "proteína diana," como se unas de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a una proteína o polipéptido, que incluyen, pero no se limitan a, una proteína que contiene una región Fc tal como un anticuerpo que se va a purificar mediante un método de la invención, de una o más impurezas.

- Polipéptidos ejemplares incluyen, *por ejemplo*, renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimulante tiroide; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena α de insulina cadena β de insulina proinsulina; hormona estimulantes del foliculo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores coagulantes tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y el factor von Willebrands; factores anti-coagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoietico; factor de necrosis tumoral α y β ; encefalinasa; RANTES (célula T normal expresada, segregada y regulada en activación, del inglés regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); proteína inflamatoria macrófaga humana (MIP-1 α); una albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora Mulleriana; cadena α de relaxina; cadena β de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como β -lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno citotóxico asociado con linfocito T (CTLA) (*por ejemplo*, CTLA-4); inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor del crecimiento del nervio, tal como NGF- β .; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento fibroblástico tal como α FGF y β FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF- β , que incluye TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento de tipo insulina I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebro), proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBPs); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 CD20, CD34, y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimulantes de colonia (CSFs), *por ejemplo*, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleuquinas (ILs), *por ejemplo*, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerante del decaimiento; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura de SIDA; proteínas de transporte; receptores de asentamiento; diriginas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos anteriormente listados.
- 45 Además, una proteína o polipéptido de la invención es un anticuerpo, fragmento o variante del mismo, que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos anteriormente listados.

- Los términos "contaminante," "impureza," y "desecho," tal como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a cualquier molécula extraña o inaceptable, que incluye una macromolécula biológica tal como una ADN, un ARN, una o más proteínas celulares huésped (HCP), endotoxinas, lípidos, y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene la proteína diana que se va a separar de una o más de las moléculas extrañas o inaceptables usando un proceso de la presente invención. Adicionalmente, tal contaminante puede incluir un reactivo que se usa o se genera en una etapa que puede producirse antes del proceso de purificación, tal como proteína A lixiviada en los casos en los que se emplea una etapa de cromatografía de afinidad de proteína A.

- 55 Los términos "proteína celular de ovario de hámster chino" y "CHOP" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a una mezcla de proteínas celulares hospedantes ("HCP") derivadas de un cultivo celular de ovario de hámster chino ("CHO"). El HCP o CHOP está presente generalmente presente como una impureza en un lisato o medio de cultivo celular (*por ejemplo*, un fluido de cultivo celular recolectado ("HCCF")) que comprende una proteína de interés tal como un anticuerpo o inmuno adhesina expresada en una célula CHO). La cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una proteína de interés proporciona una media del grado de pureza para la proteína de interés. HCP o CHOP incluye, pero no se limita a, una proteína de interés expresada por la célula huésped, tal como la célula huésped CHO. Típicamente, la cantidad de CHOP en una

mezcla proteica se expresa en partes por millón con relación a la cantidad de la proteína de interés en la mezcla. Se entiende que cuando la célula huésped es otro tipo de célula, *por ejemplo*, una célula de mamífero aparte de CHO, una *E. coli*, una levadura, una célula de insecto o una célula vegetal, HCP se refiere a las proteínas, distintas de la proteína diana, encontradas en un lisado de la célula huésped.

- 5 El término "partes por millón" o "ppm" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a una medida de pureza de una proteína diana purificadas mediante un método de la invención. Las unidades ppm se refieren a la cantidad de HCP o CHOP en nanogramos/miligramos de proteína de interés o en miligramos/mililitro (*es decir*, $\text{CHOP ppm} = (\text{CHOP ng/ml}) / (\text{proteína de interés mg/ml})$, cuando las proteínas están en disolución).

- 10 Los términos "purificar," "separar," o "aislar," como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a aumentar el grado de pureza de una polipéptido o proteína de interés de una proteína diana de una composición o muestra que comprende la proteína de interés y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la proteína de interés aumenta mediante eliminación (completa o parcial) de al menos una impureza de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso global de purificación que da como resultado una composición o muestra "homogénea", que se usa en la presente memoria para referirse a un
- 15 composición o muestra que comprende menor que 100 ppm HCP en una composición que comprende la proteína de interés, alternativamente menor que 90 ppm, menor que 80 ppm, menor que 70 ppm, menor que 60 ppm, menor que 50 ppm, menor que 40 ppm, menor que 30 ppm, menor que 20 ppm, menor que 10 ppm, menor que 5 ppm, o menor que 3 ppm de HCP.

- 20 El término "fase proteica," como se usa en la presente memoria, se refiere a la parte de una muestra donde la concentración de la proteína diana ha aumentado sustancialmente con relación a la concentración inicial de la proteína diana en la muestra. El proceso de concentración puede implicar la adsorción de proteína sobre un soporte sólido poroso o no poroso; adsorción de proteína en una interfaz líquido-aire o líquido-gas; adsorción de proteína en la interfaz entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles; precipitación de proteína como un componente puro o como un resultado de formación compleja con uno o más moléculas o polímeros diferentes; o usando
- 25 cristalización de proteínas.

El término "fase líquida" como se usa en la presente memoria, se refiere a esa parte de una muestra donde la concentración de proteína diana se ha reducido sustancialmente en comparación con la concentración inicial de proteína en la muestra. La fase líquida se puede crear en el mismo momento que la fase proteica definida anteriormente.

- 30 Los términos "proceso de flujo pasante", "modo de flujo pasante" y "cromatografía de flujo pasante", como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a una técnica de separación de producto en la se prevé que al menos un producto en una muestra fluya a través de una resina o un medio cromatográfico, mientras que al menos un componente potencial se une a la resina o al medio cromatográfico.

- 35 La muestra que se pretende hacer fluir a través se refiere generalmente como la "fase móvil." El "modo de flujo pasante" es generalmente una operación isocrática (*es decir*, un proceso cromatográfico durante el cual la composición de la fase móvil no cambia). El medio usado para el flujo pasante normalmente se pre-equilibra con la misma disolución tampón que contiene la molécula de proteína diana. Después de la purificación, el medio se puede sobrealimentar con una cantidad adicional del mismo tampón para aumentar la recuperación de producto. En algunas realizaciones, la fase móvil del "modo de flujo pasante" es una alimentación de cultivo celular que contiene
- 40 el producto de interés. En algunos casos, el pH o conductividad de la alimentación se ajusta para maximizar la eliminación de impurezas usando el proceso de flujo pasante.

En algunas realizaciones según el método reivindicado y como se describe en los Ejemplos indicados en la presente memoria, los métodos emplean una etapa de intercambio aniónico que se realiza en un modo de flujo pasante.

- 45 Los términos "modo de elución y unión" y "proceso de elución y unión," como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a una técnica de separación de producto en la que al menos un producto contenido en una muestra se une a una resina o medio cromatográfico y se eluye a continuación.

- El término "cromatografía" se refiere a cualquier clase de técnica que separa un analito de interés (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc tal como una inmunoglobulina) de otras moléculas presentes en una mezcla donde el analito de interés se separa de otras moléculas como un resultado de diferencias en las velocidades a las
- 50 que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de elución y unión.

- El término "resina de cromatografía" o "medio de cromatografía" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a cualquier clase de fase sólida porosa o no porosa que separa un analito de interés (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc tal como una inmunoglobulina) de otras moléculas presenten en una mezcla. Normalmente, el analito de interés se separa de otras moléculas como un resultado de las diferencias de las velocidades a las que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de una fase sólida estacionaria bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de elución y unión. Ejemplos no limitantes incluyen resinas con modificaciones superficiales en modo mixto, catiónico, aniónico o HIC; membranas con modificaciones superficiales
- 55

en modo mixto, catiónico, aniónico o HIC, fibras tejidas o no tejidas con modificaciones superficiales en modo mixto, catiónico, aniónico o HIC; y monolitos con modificaciones superficiales en modo mixto, catiónico, aniónico o HIC.

El término "separación por afinidad," o "purificación por afinidad," como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier técnica de purificación o ensayo que implica la puesta en contacto de una muestra que contiene un analito diana (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc tal como una inmunoglobulina) con un medio de afinidad (*por ejemplo*, un soporte sólido que lleva sobre él un ligando de afinidad que se sabe que se une al analito como, por ejemplo, Proteína A o una variante del mismo) que se sabe que se une al analito diana.

Los términos "cromatografía de afinidad" y " cromatografía de afinidad de proteínas", como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína diana (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc de interés o un anticuerpo) se une específicamente a un ligando que es específico para la proteína diana. En algunas realizaciones, tal ligando es Proteína A o Proteína G o una variante funcional de las mismas, que se une de forma covalente a un material cromatográfico de fase sólida y es accesible a la proteína diana en disolución mientras la disolución se pone en contacto con el material cromatográfico de fase sólida. La proteína diana generalmente retiene su afinidad de unión específica por el ligando durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen apreciablemente o específicamente al ligando. La unión de la proteína diana al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o las impurezas de las proteínas pasen a través del medio cromatográfico mientras que la proteína diana permanece unida específicamente al ligando inmovilizado sobre el material de fase sólida. La proteína diana específicamente unida se elimina entonces en forma activa del ligando inmovilizado en condiciones adecuadas (*por ejemplo*, pH bajo, pH elevado, sal elevada, ligando competente, *etc.*), y se hace pasar a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de la proteínas contaminantes o impurezas de proteína a las que anteriormente se les permitió pasar a través de la columna. Cualquier componente se puede usar como un ligando para purificar sus proteínas de unión específicas respectivas, *por ejemplo* anticuerpo. Sin embargo, en diversos métodos según la presente invención, la Proteína A se usa como un ligando para proteína o anticuerpo que contienen una región Fc. Las condiciones de elución del ligando (*por ejemplo*, Proteína A) de la proteína diana (*por ejemplo*, una proteína que contiene una región Fc) pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la materia. En algunas realizaciones, se puede usar como ligando la Proteína G o una variante funcional. En algunas realizaciones, se usa un ligando tal como la Proteína A a un intervalo de pH de 5-9 para unirse a una proteína que contiene una región Fc, lavar o re-equilibrar el conjugado ligando/ proteína diana, seguido de elución con un tampón que tiene pH de alrededor de o por debajo de 4.

Aunque la cromatografía de afinidad es específica para unir la proteína de interés, la cromatografía de afinidad que emplea el uso de ligandos tales como la Proteína A y la Proteína G tiende a ser muy caro y el ensuciamiento rápido de las columnas de cromatografía con materiales no específicos (*por ejemplo*, una o más impurezas) plantea un gran problema en la industria. Los métodos según la presente invención proporcionan una solución a este problema mediante el uso de materiales (*por ejemplo*, carbón activado) que reducen la carga de las columnas de cromatografía eliminando uno o más de tales materiales no específicos de la muestra, disminuyendo de ese modo el coste global, así como aumentando la vida de las columnas. Además, algunos de los métodos según la invención reivindicada dan como resultado el uso de menos etapas de cromatografía después de la etapa de cromatografía de afinidad, aumentando así la eficacia del proceso global.

En una purificación de múltiples etapas de proteínas producidas de forma recombinante, normalmente es beneficioso aislar la proteína diana de un surtido diverso de impurezas solubles presentes en el fluido de cultivo celular tempranamente en el proceso. Este aislamiento se puede conseguir bien mediante captura cromatográfica o mediante aislamiento no cromatográfico de la proteína diana.

Una etapa cromatográfica de "captura", como se usa en la presente memoria, consiste en unir la proteína diana a un medio de cromatografía posicionado justo aguas abajo de la materia prima recolectada producida bien mediante fermentación bacteriana o mediante expresión del cultivo celular. Típicamente, la materia prima recolectada se clarifica, sin embargo la captura puede realizarse también a partir de material prima sin clarificar. La función primaria de esta etapa es unir la proteína diana desde la disolución usando la menor cantidad de resina posible, permitiendo a las impurezas fluir a través. La proteína diana se eluye a continuación en un volumen significativamente menor de tampón para el procesado adicional aguas abajo. Se selecciona el medio cromatográfico que tiene la mejor combinación de capacidad de unión dinámica, recuperación de masa y retención de la actividad biológica de la diana. Para los anticuerpos que contienen una región de unión a Fc, es habitual el uso de un medio cromatográfico de afinidad, tal como los basados en la Proteína A o Proteína G.

Los medios cromatográficos usados para la captura se eligen del grupo que comprende resina porosa, membrana, monolito, materiales porosos tejidos o no tejidos.

El aislamiento no cromatográfico de la proteína diana se puede realizar mediante una o más de las etapas siguientes: adsorción de proteína sobre un soporte sólido poroso o no poroso; adsorción de proteína en una interfaz líquido-aire o líquido-gas; adsorción de proteína en la interfaz entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles; precipitación de proteína como un componente puro o como un resultado de formación compleja con uno o más moléculas o polímeros diferentes; o usando cristalización de proteínas.

El término "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico" se refieren al proceso cromatográfico en el que un soluto o analito de interés (*por ejemplo*, una proteína diana que contiene una región Fc) en una mezcla interactúa con un compuesto cargado unido mediante, *por ejemplo*, unión covalente, a un material de intercambio iónico de fase sólida tal que el soluto o el analito de interés interactúa de forma no específica con el compuesto cargado más o menos que las impurezas o contaminantes solubles en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla se eluyen desde una columna del material de intercambio iónico más rápido o más espacio que el soluto de interés o están unido a o excluidos de la resina con relación al soluto de interés. "Cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, y de intercambio iónico de modo mixto. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede unir la molécula diana (*por ejemplo*, una proteína diana que contiene una región Fc) seguido de elución (cromatografía de unión y elución de intercambio catiónico o "CIEX") o puede predominantemente unir las impurezas mientras la molécula diana "fluye a través" de la columna (cromatografía de flujo pasante de intercambio catiónico FT-CIEX). La cromatografía de intercambio aniónico puede unir la molécula diana (*por ejemplo*, una proteína diana que contiene una región Fc) seguido de elución o puede predominantemente unir las impurezas mientras la molécula diana "fluye a través" de la columna. En algunas realizaciones y como se muestra en los Ejemplos de la presente memoria, la etapa cromatográfica de intercambio aniónico se realiza en un modo de flujo pasante. En una realización particular, la etapa cromatográfica de intercambio aniónico emplea el uso de un medio de sorción poroso que comprende un sustrato poroso y un revestimiento poroso sobre el sustrato, donde el revestimiento comprende uno o más copolímeros o aminas primarias poliméricas del mismo.

El término "cromatografía de modo mixto" o "cromatografía multi-modal" como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso que emplea una fase cromatográfica estacionaria que lleva al menos dos tipos distintos de grupos funcionales, cada uno capaz de interactuar con una molécula de interés. Un ejemplo de modo cromatográfico de modo mixto es Capto™ Adhere (GE Healthcare), que es una resina de modo mixto AEX. La cromatografía de modo mixto emplea generalmente un ligando con más de un modo de interacción con impurezas y/o una proteína diana. El ligando incluye típicamente al menos dos sitios diferentes pero cooperativos que interactúan con la sustancia que se va a unir. Por ejemplo, uno de estos sitios puede tener una interacción de tipo carga-carga con la sustancia de interés, mientras que el otro sitio puede tener una interacción de tipo aceptor-donante y/o interacciones hidrofóbicas y/o hidrofílicas con la sustancia de interés. Los tipos de interacción electrónica aceptor-donante incluyen enlace de hidrógeno, π - π , catión- π , transferencia de carga, dipolo-dipolo e interacciones de dipolo inducidas. Generalmente, en base a las diferencias de la suma de interacciones, se pueden separar una proteína diana y una o más impurezas en un intervalo de condiciones.

El término "cromatografía de interacción hidrofóbica" o "HIC," como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso para separar moléculas basado en su hidrofobicidad, es decir, su capacidad de adsorber superficies hidrofóbicas de disoluciones acuosas. HIC se diferencia normalmente de la cromatografía de Fase Inversa (RP) por resinas HIC especialmente diseñadas que tienen típicamente una hidrofobicidad o densidad menor de los ligandos hidrofóbicos en comparación a las resinas RP.

La cromatografía HIC típicamente depende de las diferencias de grupos hidrofóbicos sobre la superficie de las moléculas de soluto. Estos grupos hidrofóbicos tienden a unirse a los grupos hidrofóbicos sobre la superficie de una matriz insoluble. Debido a que HIC emplea un ambiente más polar, menos desnaturizante que la cromatografía de fase inversa está siendo más popular para la purificación de proteínas, a menudo en combinación con cromatografía de intercambio iónico o de filtración de gel.

Los términos "resina de intercambio iónico," "medio de intercambio iónico" y "material de intercambio iónico" se refieren a una fase sólida que está cargada negativamente (*es decir*, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (*es decir*, una resina de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse adjuntando uno o más ligandos cargados a la fase sólida, *por ejemplo* mediante unión covalente o revestimiento no covalente o adsorción. Alternativamente, o en adición, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida.

Los términos "CEX," "medio de intercambio catiónico," "resina de intercambio catiónico" y "material de intercambio catiónico," como se usa en la presente memoria, se refieren a una fase sólida que está cargada negativamente, y que así tiene cationes libres para intercambio con cationes en una disolución acuosa que pasa sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede, *por ejemplo*, ser un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico comercialmente disponibles incluyen carboxi-metilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado sobre agarosa (*por ejemplo*, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de Pharmacia) y sulfonilo inmovilizado sobre agarosa (*por ejemplo* S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de Pharmacia).

Los términos "medio de modo mixto," "resina de modo mixto" y "resina de intercambio iónico de modo mixto," como se usa en la presente memoria, se refieren a una fase sólida que está modificada de forma covalente con restos catiónicos, aniónicos e hidrofóbicos. Una resina de intercambio iónico de modo mixto comercialmente disponible es BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) que contiene grupos de intercambio catiónico débiles, una concentración baja de grupos de intercambio aniónico y ligandos hidrofóbicos unidos a una matriz de soporte de fase sólida de gel de sílice.

El término "medio HIC" o "resina HIC" o "material HIC," como se usa en la presente memoria, se refiere a material cromatográfico usado para la separación HIC. El medio HIC se deriva normalmente de resina porosa cromatográfica modificada con ligandos hidrofóbicos tales como grupos aromáticos o alifáticos cortos. Ejemplos de medios HIC incluyen Butyl Sepharose y Phenyl Sepharose FF, ambos comercialmente disponibles en GE Healthcare. Ejemplos adicionales de resinas HIC comercialmente disponibles incluyen Fractogel® Phenyl y Fractogel® Propyl (MERCK KGA, Darmstadt, Alemania), Butyl Sepharose® y Phenyl Sepharose® (GE HEALTHCARE).

Los términos "AEX," "medios de intercambio aniónico," "una resina de intercambio aniónico" y "material de intercambio aniónico," como se usan en la presente memoria, se refieren a una fase sólida que está cargada positivamente, *por ejemplo* que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios, unidos a ellos. Una resina de intercambio aniónico comercialmente disponible incluye DEAE cellulose, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (PHARMACIA).

Los términos "Proteína A" y "ProA" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y abarcan la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida sintéticamente (*por ejemplo*, mediante síntesis peptídica o mediante técnicas recombinantes), y variantes de las mismas que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región CH₂/CH₃, tal como una región Fc. La Proteína A se puede adquirir comercialmente de Repligen, GE Healthcare y Lonza. La Proteína A se inmoviliza generalmente sobre un material de soporte de fase sólida. El término "ProA" también se refiere a una columna o resina de cromatografía de afinidad que contiene una matriz de soporte cromatográfico sólido al que está unido de forma covalente la Proteína A.

Un derivado funcional, fragmento o variante de la Proteína A usado en los métodos según la presente invención, se puede caracterizar por una constante de unión de al menos $K=10^{-8}$ M, y preferiblemente $K=10^{-9}$ M, para la región Fc del ratón IgG2a o IgG1 humana. Una interacción que cumple con ese valor para la constante de unión se denomina "unión de elevada afinidad" en el presente contexto. Preferiblemente, tal derivado funcional o variante de la Proteína A comprende al menos parte de un dominio de unión a IgG funcional de la Proteína A de tipo salvaje, seleccionado de los dominios naturales E, D, A, B, C o mutantes obtenidos por ingeniería genética de los mismos que tienen funcionalidad de unión a IgG retenida.

Una "Proteína A contaminante" según la presente invención es cualquier tipo de progenie de unión a IgG, funcional, de una Proteína A o un derivado funcional de la misma como se define anteriormente, que se obtiene después de eluir el anticuerpo unido de una columna cromatográfica de afinidad de Proteína A. Tal especie de Proteína A contaminante puede ser el resultado *por ejemplo* de la hidrólisis de enlaces peptídicos, lo que es muy probable que ocurra mediante la acción enzimática, en particular en la fabricación industrial. La cromatografía de Proteína A se aplica como una etapa temprana en el procesado corriente abajo cuando la disolución de producto recién preparado, purificada en bruto, todavía conserva una actividad proteasa considerable. Las células que mueren en el caldo de cultivo celular o las células afectadas en la centrifugación inicial o las etapas de filtración es probable que tengan proteasas libres; con propósito regulatorio, normalmente no se consigue la suplementación del caldo de cultivo celular con inhibidores de proteasa antes o en durante el procesado corriente abajo, en contraste con la práctica de la investigación bioquímica. Ejemplos son cloruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) o ácido *n*-caproico. Tales agentes químicos son indeseables como aditivos en la producción de agentes biofarmacéuticos. También es posible que los derivados funcionales recombinantes o fragmentos de Proteína A sean menos resistentes a la proteasa que la Proteína A de tipo salvaje, dependiendo de la estructura terciaria del pliegue de la proteína. Los segmentos de aminoácidos que se unen a dominios de IgG individuales se pueden exponer una vez que el número total de dominios de unión se ha reducido. Los contactos entre dominios pueden contribuir posiblemente a la estabilidad del plegamiento del dominio. También puede ser que la unión del anticuerpo por la Proteína A o dichos derivados funcionales de la misma ejerza influencia o facilite la susceptibilidad a la acción de la proteasa, debido a cambios conformacionales inducidos en la unión del anticuerpo.

La "unión" de una molécula a una resina cromatográfica significa exponer la molécula a la resina cromatográfica en condiciones apropiadas (pH/conductividad) de forma tal que la molécula se inmoviliza de forma reversible en o sobre la resina cromatográfica en virtud de interacciones ligando - proteína. Los ejemplos no limitantes incluyen interacciones iónicas entre las molécula y un grupo cargado o grupos cargados del material de intercambio iónico y una interacción bioespecífica entre la Proteína A y una inmunoglobulina.

El término "tampón de lavado" o "tampón de equilibrado" se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere a un tampón usado para lavar o reequilibrar la resina cromatográfica antes de eluir la molécula de polipéptido de interés. En algunos casos, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser el mismo. "Lavar" un medio cromatográfico quiere decir incluir hacer pasar un tampón apropiado a través o sobre el medio.

Un "tampón de elución" se usa para eluir la proteína diana de la fase sólida. La conductividad y/o pH del tampón es/son normalmente tal/tales que la proteína diana se eluye de la resina cromatográfica.

"Eluir" una molécula (*por ejemplo*, u polipéptido de interés o una impureza) de la resina cromatográfica significa eliminar la molécula de allí alterando las condiciones de disolución de forma tal que el tampón compite con la molécula de interés para unirse a la resina cromatográfica. Un ejemplo no limitante es eluir una molécula de una resina de intercambio iónico alterando la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico de

forma tal que el tampón compite con la molécula por los sitios cargados sobre el material de intercambio iónico.

El término "eluato", como se usa en la presente memoria, se refiere a una disolución que contiene una molécula de interés obtenida vía elución, así como a la fracción de flujo pasante que contiene la proteína diana de interés obtenida como resultado de la purificación de flujo pasante. En algunas realizaciones, el término "eluato" se refiere al conjunto de fracciones que es elución de una etapa de cromatografía de unir y eluir (por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A). En algunas realizaciones, el eluato de una etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A fluye en un proceso de purificación de flujo pasante que emplea carbón activado, con o sin una etapa intermedia de inactivación de virus.

El término "fase sólida" o "sustrato poroso" o "matriz base" se refiere a un material no acuoso al que se puede adherir uno o más ligandos cargados. La fase sólida puede ser una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas que es porosa o no porosa, una membrana, unas fibras tejidas o no tejidas, un monolito o un filtro. Ejemplos de materiales para formar la fase sólida incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa); y otras matrices mecánicamente estables tales como sílice (*por ejemplo* vidrio de poro controlado), poli(estirenodivinil)benceno, poli(acrilamida), éter polivinílico, nylon, polietileno de alto peso molecular (HDPE), polietersulfona, cerámicos y derivados de cualquiera de los anteriores.

Un "tampón" es una disolución que resiste cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Se describen diversos tampones que se pueden emplear dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón en Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). En algunas etapas de los métodos de la invención reivindicada, un tampón tiene un pH en el intervalo de 2,0 a 4,0, o de 2,8 a 3,8. En otras etapas de la invención reivindicada, un tampón tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 9,0. En otras etapas de la invención reivindicada, un tampón tiene un pH en el intervalo de 4,0 a 6,5. Aún en otras etapas de los métodos de la invención reivindicada, un tampón tiene un pH menor que 4,0. Ejemplos no limitantes de tampones que controlarán el pH es este intervalo incluyen tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como combinaciones de estos.

El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una disolución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En disolución, la corriente fluye por transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad en aumento de iones presente en la disolución acuosa, la disolución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medida de conductividad es milliSiemens por centímetro (mS/cm o mS), y se puede medir usando un conductímetro comercialmente disponible (*por ejemplo*, comercializado por Orion). La conductividad de una disolución se puede alterar cambiando la concentración de iones en ella. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponante y/o la concentración de una sal (*por ejemplo* NaCl o KCl) en la disolución se puede alterar para alcanzar la conductividad deseada. Preferiblemente, la concentración de la sal de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada como en los Ejemplos a continuación.

El "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refiere al pH al que la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. pI se puede calcular a partir de la carga neta del resto de aminoácido o resto de ácido siálico de los carbohidratos unidos del polipéptido o se puede determinar mediante focalización isoeléctrica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "filtrado" se refiere a esa parte de una muestra que pasa a través de un medio.

Tal como se usa en la presente memoria "retenido" se refiere a esa parte de una muestra que está sustancialmente retenida por el medio

El término "clarificación" como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso para reducir la turbidez, medida en NTU, de una disolución que contiene proteína, por eliminación de las partículas suspendidas. La clarificación se puede conseguir por una variedad de medios, que incluyen centrifugado continuo y discontinuo, filtración profunda, filtración de flujo normal y tangencial, y precipitación, que incluye floculación con especies poliméricas y moléculas pequeñas, o cualquiera de las combinaciones de los métodos anteriores.

La frase "reduciendo la carga de la columna cromatográfica" se refiere a un tratamiento o procesado de una muestra que contiene proteína, cuyo tratamiento o procesado da como resultado una disminución del ensuciado de una columna de cromatografía sobre la que la muestra proteica se carga a continuación. En un experimento cromatográfico típico, no debería haber sustancias no eluyentes o impurezas abandonadas en la fase estacionaria, dando como resultado por lo tanto en el ensuciado de una columna de cromatografía. Este problema además se intensifica durante el escalado, donde el grado de ensuciado de la columna es mayor debido al mayor nivel de impurezas presente. El ensuciado de las columnas también da como resultado una disminución significativa de la duración de las columnas, que son normalmente muy caras. Los métodos según la presente invención proporcionan métodos mejorados para reducir significativamente la carga de las columnas cromatográficas, aumentando así la duración de las columnas, así como dando como resultado un mayor rendimiento de proteína. Los métodos según la presente invención dan como resultado una eliminación de cantidades significativas de impurezas antes de cargar la muestra en una columna de cromatografía, reduciendo la carga de la columna. Las impurezas típicas incluyen proteína de célula huésped, ADN, ácido graso (de restos de células), moléculas colorantes, agentes

desespumantes, etc.

El término "etapa del proceso" u "operación unitaria," como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere al uso de uno o más métodos o dispositivos para conseguir un cierto resultado en un proceso de purificación. Ejemplos de etapas de proceso u operaciones unitarias que se pueden emplear en los procesos y sistemas escritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, clarificación, captura cromatográfica de unir y eluir, inactivación de virus, purificación con flujo pasante y formulación. Se entiende que cada una de las etapas del proceso u operaciones unitarias puede emplear más de una etapa o método o dispositivo para conseguir el resultado pretendido de esa etapa del proceso u operación unitaria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de purificación de flujo pasante, como se describe en la presente memoria, puede emplear más de una etapa o método o dispositivo para lograr esa la etapa del proceso u operación unitaria, donde al menos tal etapa implica carbón activado. En algunas realizaciones, uno o más dispositivos que se usan para realizar una etapa del proceso u operación unitaria son de un solo uso o desechables y se pueden retirar y/o reemplazar sin tener que reemplazar otros dispositivos en el proceso o incluso teniendo que parar la marcha de un proceso.

Como se usa en la presente memoria, el término "tanque de conjunto de fracciones" se refiere a cualquier contenedor, vasija, depósito, tanque o bolsa que se usa generalmente entre las etapas del proceso y tiene un tamaño/volumen para permitir la recogida del volumen completo de salida de una etapa del proceso. Los tanques de conjunto de fracciones se pueden usar para contener o almacenar o manipular preparaciones de disoluciones del volumen completo de salida de una etapa del proceso. En algunas realizaciones, los procesos descritos en la presente memoria obvian la necesidad de usar uno o más tanques de conjunto de fracciones.

El término "tanque compensador" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier contenedor o vasija o bolsa que se usa entre las etapas del proceso o en una etapa del proceso (por ejemplo, cuando una única etapa del proceso comprende más de una etapa); donde la salida de una etapa fluye a través del tanque de compensación hacia la siguiente etapa. De acuerdo con esto, un tanque de compensación es diferente de un tanque de conjunto de fracciones, en que no tiene por objeto contener o almacenar el volumen completo de salida de una etapa; sino que permite el flujo pasante de salida de una etapa a la siguiente. En algunas realizaciones, el volumen de un tanque de compensación usado entre dos etapas del proceso o en una etapa del proceso en un proceso o sistema descrito en la presente memoria, no es más del 25% del volumen completo de salida de la etapa del proceso. En otra realización, el volumen de un tanque de compensación no es más del 10% del volumen completo de la salida de una etapa del proceso. En algunas otras realizaciones, el volumen de un tanque de compensación es menor que 35%, o menor que 30%, o menor que 25%, o menor que 20%, o menor que 15%, o menor que 10% del volumen completo de un cultivo celular en un biorreactor, que constituye el material de partida a partir del cual se va a purificar una molécula diana. En algunas realizaciones, se emplea un tanque de compensación durante una etapa del proceso de purificación de flujo pasante que usa carbón activado seguida de cromatografía AEX, seguida de cromatografía CEX, seguida de filtración de virus, donde el tanque de compensación se usa para realizar el cambio de disolución después de la etapa de cromatografía AEX.

El término "proceso continuo," como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso para purificar una molécula diana, que incluye dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), de forma que la salida de una etapa del proceso fluye directamente hacia la etapa del proceso siguiente en el proceso, sin interrupción, y donde dos o más etapas del proceso se pueden realizar concurrentemente durante al menos na parte de su duración. En otras palabras, un proceso continuo obvia la necesidad de completar una etapa del proceso antes de realizar la etapa del proceso siguiente en el proceso de purificación. El término "proceso continuo" también se aplica a las etapas dentro de una etapa del proceso, en cuyo caso, durante la realización de una etapa del proceso que incluye etapas múltiples, la muestra fluye de forma continua a través de diversas etapas que son necesarias para realizar la etapa del proceso. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, una etapa de purificación de flujo pasante que emplea carbón activado se realiza de manera continua, donde el aluato de una etapa de cromatografía de unir y eluir (por ejemplo, etapa de captura cromatográfica de Proteína A), que precede la etapa de purificación de flujo pasante, fluye hacia una etapa de carbón activado (rellenado en medio celulósico) seguido de una etapa de cromatografía AEX, seguida de una etapa de cromatografía CEX y seguida de una etapa de filtración de virus

El término "mezclador estático" se refiere a un dispositivo para mezclar dos materiales fluidos típicamente líquidos. El dispositivo consiste generalmente de elementos del mezclador (también referidos como elementos no móviles) contenidos en un alojamiento cilíndrico (tubo). Mientras las corrientes se mueven a través del mezclador estático, los elementos no móviles mezclan de forma continua los materiales. La mezcla completa depende de muchas variables que incluyen las propiedades de los fluidos, diámetro interno del tubo, número de elementos del mezclador y su diseño etc. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, uno o más mezcladores estáticos se usan en los procesos descritos en la presente memoria, por ejemplo, entre una etapa de cromatografía AEX y una etapa de cromatografía CEX.

Esta invención se ilustra además mediante los ejemplos siguientes, que no deberían interpretarse como limitantes.

II. Materiales carbonosos ejemplares para Uso en los Métodos Reivindicados

En los métodos según la presente invención, algunos materiales carbonosos tales como carbón activado, se usan en

la purificación de proteínas. El carbón activado se puede describir como un sólido poroso con un área superficial muy elevada. En algunas realizaciones, el carbón activado comprende carbón vegetal activado. El carbón activado puede derivarse de una variedad de fuentes que incluyen, pero no se limitan a, carbón, madera, cáscara de coco, cáscara de nuez y turba. El carbón activado se puede producir a partir de estos materiales mediante activación física que implica calentar en una atmósfera controlada o mediante activación química que utiliza ácidos fuertes, bases, u oxidantes. Los procesos de activación producen una estructura porosa con un área superficial elevada que proporciona al carbón activado una capacidad mayor para la eliminación de impurezas. Los procesos de activación se pueden modificar para controlar la acidez de la superficie.

El carbón activado está disponible en una amplia variedad de fuentes comerciales y viene en una cantidad de calidades y formatos. Algunos de los proveedores comerciales de carbón activado incluyen compañías como MeadWestVaco Corp., Richmond, VA, EE.UU.; Norit Americas Inc., Marshall, TX, EE.UU.; Calgon Carbon Corp., Pittsburgh, PA, EE.UU..

Dos de los principales formatos de carbón activado son el polvo y granular. El carbón activado en polvo contiene partículas pequeñas y normalmente menores que 1 mm de diámetro, y se usa lo más común para la purificación de líquidos. El carbón activado granular tiene un tamaño de partícula mayor y por consiguiente un área superficial menor, así que se prefiere para uso en la purificación de gas donde la velocidad de difusión es mayor.

Una consideración importante para la seguridad con el uso de carbón activado es aplicaciones de consumo (tales como la purificación de agua, alimentos, bebidas y de productos farmacéuticos) es la reducción y control de compuestos extraíbles. El carbón activado previsto para aplicaciones de agua potable y contacto alimentario se obtiene normalmente de acuerdo con la norma de seguridad ANSI/NSF Standard 61 que cubre todos los aditivos indirectos del agua. También, el método de ensayo D6385 de la norma ASTM describe la determinación del contenido extraíble de ácido en el carbón activado mediante cenizas y se podría usar para estudiar y minimizar el nivel de extraíbles del carbón activado.

Está disponible un intervalo de tipos de carbón activado para diversas aplicaciones. Por ejemplo, MeadWestVaco Corp. suministra al menos doce tipos de carbón activado en polvo que pueden variar por su capacidad, acidez superficial, accesibilidad de los poros a moléculas diana y aplicación pretendida. Generalmente es deseable maximizar la capacidad del carbón activado de eliminar impurezas.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el carbón activado se incorpora en un medio celulósico.

III. Procesos de Purificación de Flujo Continuo Convencionales

La mayoría de los procesos de purificación de flujo pasante convencionales se basan claramente en diferentes interacciones superficiales entre la proteína diana de interés y la impureza que se va a eliminar. Por ejemplo, la purificación convencional de flujo pasante AEX de anticuerpos monoclonales se basa en el hecho de que el punto isoeléctrico de la mayoría de los anticuerpos es mayor que otras proteínas y ácidos nucleicos y está normalmente por encima de 7. Por lo tanto, los procesos AEX de purificación de flujo pasante se llevan a cabo a un pH que es menor que el pI del anticuerpo que se va a purificar con el fin de asegurarse de que la fase estacionaria y el anticuerpo tienen la misma carga y por lo tanto el anticuerpo fluye a través del medio sin unirse de forma significativa a la superficie. Por otro lado, muchas impurezas proteicas, ácidos nucleicos, y endotoxinas tienen un pI más bajo que un anticuerpo, que es por lo general por debajo de 7, y en consecuencia, se unen a la superficie de un medio de AEX.

Como la mayoría de los procesos de cromatografía de intercambio iónico, la purificación de flujo pasante AEX es generalmente sensible a la conductividad de la disolución y es generalmente menos eficaz a mayor salinidad. En un típico proceso de purificación de un anticuerpo monoclonal, la purificación de flujo pasante AEX, a veces referida como la "etapa de pulido," sigue una o más etapas de cromatografía en columna de unir y eluir.

A continuación se muestran dos modelos de procesos comúnmente más utilizados:

- 1) captura de Proteína A → purificación y concentración de unir y eluir CEX → Dilución → flujo pasante AEX
- 2) captura de Proteína A → flujo pasante AEX → purificación y concentración de unir y eluir CEX

Además de estos modelos de proceso empleados comúnmente, a veces se emplean otros esquemas de purificación, incluyendo la captura de CEX y el uso de resinas inorgánicas de unir y eluir de modo mixto (tales como Hidroxiapatita Cerámica, CHT). En general, el objetivo de la purificación de flujo pasante es eliminar niveles de trazas de impurezas, mientras que la mayor parte de la purificación se realiza usando etapas de unir y eluir. Sin embargo, un cambio del uso principalmente de etapas de unir y eluir a un proceso de purificación de flujo pasante puede ser una solución muy rentable que ahorra tiempo, reactivos, así como costes operativos. Por consiguiente, los procesos descritos en la presente memoria proporcionan una solución viable a los procesos convencionales en que son más rentables y reducen la fabricación global y los costes operativos.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se proporcionan procesos de purificación de flujo

pasantes mejorados, que permiten que la purificación de flujo pasante se realice de una manera continua.

IV. Uso de Material Carbonoso en Procesos de Purificación

Como se ha discutido anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos de purificación de nuevos y mejorados que emplean carbón activado. El carbón activado puede ser añadido directamente a una etapa de purificación y, posteriormente, se puede eliminar por sedimentación o filtración, o haciendo pasar una disolución o gas a través de un dispositivo que contiene carbón activado. El carbón activado o bien puede ser rellenado independientemente en un dispositivo adecuado o se puede mezclar con otros materiales que mejoren sus propiedades mecánicas, flujo, o separación. Por ejemplo, el carbón activado puede incorporarse en un medio fibroso que contiene celulosa dejado en húmedo, y luego sellado dentro de un dispositivo desechable tal como Millistak + ® Pod CR disponible de Millipore Corporation, o Seitz® AKS Filter Media disponible de Pall Corporation, Port Washington, NY, EE.UU.. Otro formato de carbón activado es un bloque de carbón activado, donde el carbón activado se incorpora en un monolito poroso presionando junto con polvo termoplástico. La forma granular del carbón activado también se puede rellenar en columnas, similar al medio cromatográfico, o puede rellenarse en un dispositivo adecuado. En general se acepta que activa el medio de carbón activado se utiliza para la decoloración, la eliminación de pequeñas impurezas de moléculas, etc. Por ejemplo, hay varias calidades de medios de carbón activado disponibles de Pall Corporation, que pueden ser seleccionados en base al peso molecular de impurezas diana. Están disponibles tres intervalos de pesos moleculares: 200-400, 400-1,000, y 400-1,500 Dalton, siendo el último el más grande. Sin embargo, ninguno de los medios de carbón activado comercialmente disponibles se han descrito para la eliminación selectiva de impurezas mucho más grandes de muestras biológicas, que van desde 2.000 a 200.000 Dalton de peso molecular.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que el carbón activado es capaz de unirse selectivamente a impurezas indeseables (por ejemplo, HCP y ADN), mientras que al mismo tiempo muestra una unión insignificante a una proteína diana.

Esta invención también se reconoce el hecho de que, similar a todo el material de adsorción, la capacidad de adsorción del carbón activado no es ilimitada. Por ejemplo, en el caso de alimentación CHO-S, el carbón activado ha mostrado que elimina eficazmente tanto HCP y ADN cuando estas especies estaban presentes a concentraciones que se observaron en alimentaciones representativas como se muestra en el Ejemplo 1. Sin embargo, la adición de ADN a un nivel inusualmente alto se encontró que suprimía la eficacia de eliminación de HCP del carbón activado como se muestra en el Ejemplo 2.

El carbón activado también puede ser altamente beneficioso en la eliminación de los componentes potenciales de medios de cultivo celular que pueden estar presentes en la disolución de la proteína diana, tanto antes como después de la etapa de captura de la proteína diana. Los componentes típicos de medios de cultivo celular incluyen tensoactivos (por ejemplo, Pluronic® F68), insulina, antibióticos, metotrexato, y antiespumante. Debido a un riesgo de que algunos de estos componentes sean trasladados a una proteína diana purificada, es ventajoso incorporar una etapa en un tren de purificación de proteínas que sea capaz de eliminar estos componentes. El carbón activado se puede usar en un proceso de purificación para eliminar tales componentes, como además es evidenciado por los Ejemplos de la presente memoria.

Los siguientes son ejemplos de procesos de purificación de proteínas que incorporan carbón activado como una o más etapas intermedias, que se muestra mediante subrayado en la siguiente Tabla I siguiente. Se entiende que pueden ser utilizadas muchas variaciones de estos procesos.

TABLA I

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
Proceso A	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	Carbon activado flujo pasante	unir y eluir con medio de Afinidad	unir y eluir con medio CEX	Medio AEX flujo pasante
Proceso B	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	unir y eluir con medio de Afinidad	Carbon activado flujo pasante	unir y eluir con medio CEX	Medio AEX flujo pasante
Proceso C	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	unir y eluir con medio de Afinidad	unir y eluir con medio CEX	Carbon activado flujo pasante	Medio AEX flujo pasante
Proceso D	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	unir y eluir con medio de Afinidad	unir y eluir con medio CEX	Medio AEX flujo pasante	Carbon activado flujo pasante
Proceso	Proporciona Fluido de	unir y eluir con	Carbon activado	Medio AEX flujo	

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
E	Cultivo Celular Clarificado	medio de Afinidad	flujo pasante	pasante	
Proceso F	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	unir y eluir con medio CEX	Carbon activado flujo pasante	Medio AEX flujo pasante	
Proceso G	Proporciona Fluido de Cultivo Celular Clarificado	unir y eluir con medio de Afinidad	Carbon activado flujo pasante	Medio AEX flujo pasante	Medio CEX flujo pasante

5 En general, en la tabla anterior, la etapa de unir y eluir con medio de Afinidad, y/o de unir y eluir con medio CEX se puede operar en cualquiera de tres modos: (1) el modo discontinuo, donde el medio se carga con la proteína diana, la carga se para, el medio se lava y se eluye y se recoge el conjunto de fracciones; (2) modo semicontinuo, donde la carga se realiza de forma continua, mientras que la elución es intermitente (por ejemplo, en el caso de cromatografía multicolumna continua); y (3) modo totalmente continuo, donde tanto la carga como la elución se realizan de forma continua.

10 En algunas realizaciones, uno o más procesos descritos en la Tabla anterior, se puede realizar una etapa de inactivación de virus después de la etapa de unir y eluir y antes de someter el eluato a una etapa de purificación de flujo pasante, como se describe en la presente memoria.

15 Se entiende que los procesos descritos en la presente memoria y en la Tabla anterior puede emplear además etapas adicionales, así como etapas para el cambio de las condiciones de la disolución en línea o a través de un tanque de compensación. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, un proceso incluye las etapas siguientes: clarificación; unir y eluir con medio de afinidad de Proteína A; inactivación de virus en línea; purificación de flujo pasante como se indica a continuación: Carbón activado seguido de medio AEX de flujo pasante seguido de un cambio de disolución usando un mezclador estático y/o tanque de compensación en línea, seguido del medio CEX de flujo pasante seguido de filtración de virus; y formulación.

V. Ensayo de Niveles Reducidos de Una o Más Impurezas

20 La presente invención proporciona procesos para reducir el nivel de una o más impurezas presentes en una muestra que contiene una proteína de interés. Las impurezas típicas contenidas en una muestra proteica derivada de una fuente biológica incluyen proteínas de células huésped (HCP) y ácidos nucleicos (ADN). Cuando una célula huésped es Ovario de Hámster Chino (CHO), la HCP se denomina comúnmente como CHO HCP o CHOP. Los métodos inmunológicos que usan anticuerpos a HCP tales como Western Blot y ELISA se usan convencionalmente para la detección de tales impurezas. Los ensayos inmunoenzimáticos de placa de microtitulación (ELISA) se emplean también de forma rutinaria para proporcionar una alta sensibilidad de análisis. Tales ensayos son sencillos de usar, objetivos, y herramientas poderosas para medir el nivel de una o más impurezas durante procesos de purificación.

30 Algunos de los kits ELISA para medir HCP están comercialmente disponibles de vendedores tales como, *por ejemplo*, Cygnus Technologies of Southport, NC, EE.UU.. Algunos de tales kits son "genéricos" en el sentido de que están previstos para reaccionar con esencialmente todas las HCPs que podrían contaminar el producto independientemente del proceso de purificación que se ha usado. En algunas realizaciones, se pueden usar kits comercialmente disponibles para detectar el nivel de una o más impurezas en una muestra.

Esta invención se ilustra además mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Evaluación de diversos materiales para la eliminación de impurezas en modo de flujo pasante

35 En teste experimento, se evaluaron diferentes materiales de su capacidad de eliminar impurezas de una alimentación CHO clarificada. Se ensayaron materiales, mostrados en la Tabla II, para la eliminación de impurezas en modo de flujo pasante. Se usó disolución salina de tampón fosfato (PBS, fosfato 10 mM, pH 7,4) como un tampón de equilibrio y lavado.

Tabla II

Material	Acrónimo	Descripción	Vendedor/Catálogo
Carbón activado	AC	RGC 80	MeadWestVado
SP sepharose FastFlow	SP FF	Resina agarosa de cromatografía de intercambio catiónico (CIEX)	GE Healthcare
ProRes™-S	ProRes™-S	Resina polimérica de cromatografía de intercambio catiónico (CIEX)	Millipore Corporation
Q sepharose FastFlow	Q FF	Resina agarosa de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX)	GE Healthcare
Phenyl Sepharose FastFlow	Ph FF	Resina agarosa de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	GE Healthcare

Se usó el método de flujo pasante por gravedad (FT) para ensayar la eliminación de impurezas de la resina. Se dejó que se asentara un ml de cada material listado en la Tabla II (1 ml) y se rellenó en una columna desechable de cromatografía de 5 ml (Evergreen Scientific, LA, CA). Las columnas se equilibraron con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio (PBS), cargado con 20 CV de alimentación y se lavaron con 5 CV de tampón de lavado (PBS) de nuevo. Se recogieron las fracciones de eluyente de flujo pasante. Se usó alimentación CHO-S nula clarificada con la adición de una IgG policlonal (~ 2,6 mg/ml, SeraCare).

El eluyente de flujo pasante y la alimentación correspondiente se ensayaron para su rendimiento IgG, eliminación de especies activas UV (280 nm), eliminación de HCP y eliminación de ADN. Se cuantificó el rendimiento IgG en una HPLC Waters Alliance (Milford, MA) usando columna analítica de Proteína A Poros de 2,1mm X 30 mm (LIFE TECHNOLOGIES, Palo Alto, CA) según las instrucciones del vendedor. Se cuantificaron las especies activas UV a 280 nm usando el área del pico de las especies no de retención que se muestran como el pico de flujo pasante en el cromatograma de Proteína A. Se detectó la proteína de célula huésped usando el kit CHO-CM HCP ELISA (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC). Se detectó el ADN usando reactivo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (LIFE TECHNOLOGIES, Foster City, CA). Todos los ensayos se realizaron según los protocolos de fabricación. Los resultados se representan en las Figuras 1-4.

Como se representa en la Figura 1, excepto para la resina HIC, que muestra ~5% IgG de pérdida de rendimiento, todos los otros medios evaluados, es decir, carbón activado, SPFF, ProRes™-S, y QFF no mostraron una pérdida de rendimiento detectable.

Además, como se representa en las Figuras 2, 3 y 4, el carbón activado ha resultado en una reducción significativa de los niveles de especies activas UV a 280 nm. Esto incluye indicadores pH, alguna población de HCP, ADN y algunos componentes de cultivo celular residuales. En el caso en que se ha usado IgG policlonal, esta fracción también incluye la población IgG 3 que la Proteína A no une. Mientras que todos los materiales parecía que eliminaban HCP en algún grado, incluyendo carbón activado, los dos materiales con funcionalidad de intercambio catiónico, Sepharose FastFlow y ProRes™-S, eliminaron la mayor parte de HCP. Como para la eliminación de ADN, aunque no fue sorprendente ver una eliminación significativa de ADN mediante una resina de intercambio aniónico, Q FastFlow, era inesperado ver que el carbón activado eliminaba el ADN con una capacidad similar. Todos los otros materiales eliminaban ADN en un menor grado.

Los datos de este ejemplo demuestran que el carbón activado, así como los materiales con intercambio catiónico, intercambio aniónico y grupos funcionales de interacción hidrofóbica, pueden eliminar impurezas (HCP, ADN y especies activas UV) a diversos grados sin pérdida de rendimiento significativa en modo de flujo pasante a partir de una alimentación CHO.

Ejemplo 2. Capacidad de eliminación de impurezas en flujo pasante

En un experimento significativo, se evaluó la cantidad de impurezas eliminada por diferentes materiales por unidad de volumen. El nivel de ADN en la alimentación CHO-S aumentó durante la adición de ADN de esperma de arenque comercialmente disponible para entender el efecto de la competición de adsorción entre ADN y HCP. Los materiales que se evaluaron para la eliminación de impurezas se listan en la Tabla III a continuación.

Tabla III

Material	Acrónimo	Descripción	Vendedor/Catálogo
Carbón activado	AC	Carbón activado	MeadWestVaco RGC 80
SP sepharose FastFlow	SP FF	resina de cromatografía de intercambio catiónico (CIEX), matriz de base agarosa	GE Healthcare, Cat# 17-0729-01
ProRes™-S	ProRes™-S	resina de cromatografía de intercambio catiónico (CIEX), matriz de base polimérica	Millipore Corporation
Q sepharose FastFlow	Q FF	resina de cromatografía de intercambio aniónico (CIEX), matriz de base agarosa	GE Healthcare, Cat# 17-0510-01

5 Cada uno de los materiales listados en la Tabla III (1 ml) se rellenaron en una columna Omnifit (0,66 cm d.i.). Las columnas se equilibraron con 5 CV PBS, se cargaron con 100 CV de alimentación CHO-S clarificada nula sin tratar con la adición de IgG policlonal y ADN de esperma de arenque y se lavaron con 20 volúmenes de columna de PBS sobre un BioCad (APPLIED BIOSYSTEMS, Palo Alto, CA). Las fracciones de eluyente de flujo pasante durante la etapa de carga se recogieron cada 10 volúmenes de columna. Las fracciones de eluyente de flujo pasante y las alimentaciones correspondientes se ensayaron para el rendimiento IgG, especies activas UV, eliminación de HCP y ADN usando los mismos métodos que los descritos en el Ejemplo 1.

10 Como se representa en la Figura 5, todos los materiales evaluados no mostraban una pérdida significativa de rendimiento IgG en la carga de 100 volúmenes de columna de alimentación. Como se representa en la Figura 6, el carbón activado eliminó la mayor parte de las especies activas UV a través de los 100 CV. El material de intercambio aniónico también eliminó especies activas UV en algún grado a través de los 100 CV. Además, como se representa en la Figura 7, la capacidad de eliminación de HCP por una resina de intercambio aniónico, Q FastFlow, era limitada, ya que se derrumbaba desde las fracciones tempranas. Sin embargo, los materiales de intercambio catiónico, Q FastFlow y ProRes™-S, eliminaron una cantidad significativa de HCP a través de 100 volúmenes de columna. Con la elevada concentración de ADN (*es decir*, unos 195 µg/mL adicionales) es este experimento específico, el carbón activado eliminó menos HCP en comparación a con las alimentaciones sin el ADN añadido. Por ejemplo, en un experimento similar con la alimentación CHO-S nula original son la adición de ADN, el carbón activado eliminó cerca de 20% HCP a través de los 100 CV (datos no mostrados). Esto demostró algún grado de competición de ADN y HCP por la adsorción al carbón activado. Además, como se representa en la Figura 8, todos los materiales eliminaron ADN en algún grado.

25 Los datos de este ejemplo demuestran que el carbón activado, así como los materiales con intercambio catiónico, intercambio aniónico y grupos funcionales de interacción hidrofóbica, pueden eliminar impurezas (HCP, ADN y especies activas UV) a diversos grados sobre 100 volúmenes de columna, sin pérdida de rendimiento significativa en modo de flujo pasante a partir de una alimentación de células CHO.

Ejemplo 3. Efecto de combinaciones de diferentes materiales en la eliminación de impurezas

30 En otro experimento, se evaluaron para la eliminación de impurezas diferentes combinaciones de materiales, mostrados en el diagrama de flujos representado en la Figura 9. Se dejó que los materiales (1 ml) se asentasen y se rellenaron en una columna de cromatografía de 5 ml desechable. Las columnas se equilibraron con 5 CV de PBS, se cargaron con 20 CV de alimentación y se lavaron con 5 CV de PBS.

35 La fracción de eluyente de flujo pasante se cargó adicionalmente en la siguiente columna desechable del medio seleccionado (como se muestra en los dos diagramas de flujo representados en la izquierda en la Figura 9). Se analizó el último eluyente de flujo pasante en el diagrama de flujo. En el caso del diagrama de flujo representado en la derecha, en el que una alimentación corría a través de una mezcla de medios, el eluyente se analizó directamente. La alimentación se preparó usando alimentación CHO-S sin expresar con adición de IgG policlonal (~ 2,5 mg/ml) de SeraCare. Las fracciones de eluyente de flujo pasante y las alimentaciones correspondientes se ensayaron para el rendimiento IgG, especies activas UV, eliminación de HCP y ADN usando los mismos métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Figuras 10-12.

40 Como se representa en la Figura 10, el carbón activado y las mezclas que contienen carbón activado reducen significativamente el nivel de las especies activas UV. Además, aunque todos los materiales presentaban eliminación de HCP en algún grado, la mezcla de carbón activado en combinación con una resina catiónica mostraba la eliminación más eficaz de HCP, como se representa en la Figura 11. También, como se representa en la Figura 12, aunque todos los materiales eliminaban ADN en algún grado, la combinación de carbón activado y una

resina de intercambio aniónico mostraba la eliminación más eficaz de ADN.

Los datos de este ejemplo demuestran que la combinación de carbón activado y materiales con intercambio catiónico, intercambio aniónico y grupos funcionales con interacción hidrofóbica pueden eliminar impurezas (HCP, ADN y especies activas UV) de forma más eficaz que cualquier componente único en modo de flujo pasante a partir de una alimentación CHO.

Ejemplo 4. Eliminación de impurezas de un conjunto de fracciones de elución de Proteína A

En otro experimento, se usó el método estándar de flujo pasante por gravedad para investigar la eliminación de impurezas en un conjunto de fracciones de post Proteína A. Se evaluaron los materiales evaluados en el Ejemplo 1, es decir, carbón activado, resinas de intercambio catiónico (SP FF y ProRes™-S), resina de intercambio aniónico, Q FF, y resina HIC, Phenyl FastFlow y diferentes combinaciones de estos materiales. Se dejó que se asentase el carbón activado o material de resina (1 ml) y se rellenó en una columna de cromatografía desechable de Evergreen. Cada columna se equilibraron con 5 CV de PBS, se cargó con 20 CV de alimentación y se lavó con 5 CV de PBS. Se recogieron durante la etapa de carga las fracciones de eluyente de flujo pasante. La alimentación usada era un conjunto de fracciones de Proteína A (ProSep Ultra Plus) (~ 3,2 mg/ml IgG) después de ajustar el pH a 7,0. La alimentación para la columna de Proteína A era CHO-S no expresante a la que se añadió IgG policlonal.

Las fracciones de eluyente de flujo pasante y el conjunto de fracciones de elución de Proteína A se evaluaron para el rendimiento de IgG, eliminación de especies activas UV, eliminación de HCP y eliminación de ADN. Todos los ensayos se realizaron como se describe en el Ejemplo 1, excepto que en el caso de HCP, se usó el kit CHO-3G HCP ELISA (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC).

Como se representa en la Figura 13, todos los materiales evaluados generaron un rendimiento del ~85% o mayor. El carbón activado, resina de intercambio catiónico, SP FastFlow, eliminaron el máximo HCP como un solo material. La mezcla de diferentes materiales proporcionó la mayor eliminación de HCP, como se representa en la Figura 14. La Figura 15 representa el hecho de que todo el material elimina una cantidad significativa de ADN, parcialmente debido al bajo nivel en la alimentación. Globalmente, las mezclas de materiales eran generalmente más eficaces en la eliminación de impurezas en comparación a un solo material.

Los datos de este ejemplo demuestran que el carbón activado y los materiales con intercambio catiónico, intercambio aniónico y grupos funcionales de interacción hidrofóbica, así como la mezcla de estos materiales pueden eliminar impurezas (HCP, DNA y especies activas UV) a diferentes grados en el modo de flujo pasante de una mezcla de fracciones de elución de Proteína A generada a partir de una alimentación CHO.

Ejemplo 5. Preparación de una alimentación MAb capturada representativa basada en afinidad (Proteína A) para evaluar el comportamiento del carbón activado para la purificación de MAb

Un anticuerpo monoclonal parcialmente purificado, referido como MAb I, se produjo usando una línea de cultivo CHO para uso como una alimentación de anticuerpo monoclonal capturada de afinidad representativa (Proteína A) para evaluar el comportamiento del carbón activado para purificar proteínas. El cultivo celular era primero clarificado directamente de un biorreactor usando medios de filtración profunda, disponibles como filtros Millistak® POD (MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, EE.UU.). El fluido de cultivo celular se filtró a través de una serie de dos filtros, DOHC y XOHC a una turbidez final de < 10 NTU, y posteriormente se filtró de forma estéril con un filtro de cápsula Millipore Express® SHC.

Se rellenó una columna acrílica Quick-Scale® de 14 cm ID de Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU. con un medio de Proteína A de capacidad elevada Millipore ProSep-vAcity a un volumen de lecho de aproximadamente 3,2 L. La columna se rellenó usando una combinación de rellenado por flujo con PBS y vibración. Todas las etapas de cromatografía se realizaron en un sistema Millipore K-Prime 40-1 con detección realizada usando absorción UV a una longitud de onda de 280 nm. La columna se usó para la purificación de MAb I durante al menos cinco ciclos y se almacenó en PBS a 4 °C. Antes de usar la columna, se limpió con al menos 2 volúmenes de columna (CV) de ácido fosfórico 0,15 M pH 1,5-1,7 y después se equilibró con PBS hasta que el pH se estabilizó (al menos 3 CV). Típicamente, el día después de la clarificación, el cultivo celular filtrado de forma estéril clarificado se cargó en la columna de Proteína A a un tiempo de permanencia de al menos 5 minutos (es decir, un caudal de 500 - 600 mL min⁻¹). La columna se cargó para asegurar que no se excedía la capacidad máxima de la columna, que se definió como 30 g de MAb I por litro de medio.

Después de la carga de la columna, la columna se limpió con PBS al mismo tiempo de permanencia hasta que las trazas UV alcanzaron la línea e base, típicamente en tres CV. Después se lavó la columna con acetato de sodio 20 mM con NaCl 0,5 M a pH 6 durante al menos tres CV, pero no más de cinco CV. A continuación se eluyó el producto usando una etapa de cambio a ácido acético 20 mM pH 3,0, donde la captura del pico de elución se realizó manualmente para reducir la dilución del pico de elución. Se dejó que el eluato incubase a temperatura ambiente (20-25 °C) durante al menos 30 minutos hasta un máximo de 1,5 horas. Después de la incubación, el pH de la mezcla de fracciones de elución se titró a pH 5 ± 0,2 usando base Tris 2 M a pH 10 o mayor. El pH de partida de la mezcla de fracciones de elución era típicamente próximo a 4,0 y requería menor que 5 % en volumen de adición de la disolución base Tris. Durante la titración de la mezcla de fracciones de elución se observó un precipitado visible.

La eliminación de los precipitados se realizó usando un Millipore Millistak® X0HC POD escala lab antes de la filtración en condiciones estériles de mezcla de fracciones de elución, donde al menos se requirieron dos vainas (POD) de 0,027 m² para clarificar los precipitados de la mezcla de fracciones de elución completa. Después de la filtración profunda, el eluato se filtró en condiciones estériles usando unidades de filtro Millipore Express Plus Stericup y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 6. Preparación de una alimentación MAb capturada representativa basada en no-afinidad (intercambio catiónico) para evaluar el comportamiento del carbón activado para la purificación de MAb

Un anticuerpo monoclonal parcialmente purificado, referido como MAb I, se produjo usando una línea de cultivo CHO para uso como una alimentación de anticuerpo monoclonal capturada de no-afinidad representativa (intercambio catiónico) para evaluar el comportamiento del carbón activado para purificar proteínas. SE obtuvo un fluido clarificado de cultivo celular MAb I como se ha discutido en el Ejemplo 5. El fluido de cultivo celular se filtró a través de una serie de dos filtros, D0HC y X0HC a una turbidez final de < 10 NTU, y posteriormente se filtró de forma estéril con un filtro de cápsula Millipore Express® SHC.

Se rellenó una columna de laboratorio de 22 cm ID glass Vantage® de Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU. con el medio de intercambio catiónico (CEX) Fractogel® SO₃⁻ (M). La columna se rellenó usando PBS sobre un Äkta® Explorer 100 (GE HEALTHCARE, Uppsala, Suecia) con velocidades lineales superficiales de aproximadamente 1000 cm h⁻¹. La caída de presión a través de la columna se mantuvo por debajo de tres bar durante el relleno y todos los ensayos de la columna posteriores. La compresión del lecho de la columna fue de aproximadamente 15 % con un volumen de lecho relleno de 75 mL. La eficacia de relleno de la columna se midió usando una inyección de pulso de 500 µL de Tris 25 mM, NaCl 1M, acetona al 3 % (v/v) a pH 6,9 a una velocidad lineal superficial de 100 cm h⁻¹ usando PBS como el tampón de ensayo. Se calculó la altura equivalente a un plato teórico (HETP) usando el pico de acetona usando métodos estándar después de contar el volumen muerto del sistema y se calculó como 0,053 cm con una asimetría del pico de 1,3, indicando que la columna estaba rellena suficientemente. El pico de NaCl mostraba un nivel mayor de asimetría del pico, pero esto es probable que esté relacionado con la interacción de los iones salinos con el medio y no una representación de la eficacia de la columna.

Antes del primer uso de la columna, se realizó un ensayo en blanco completo sin una carga proteica para reducir y/o eliminar cualquier interacción relacionada con la disolución con el medio base. Antes de la carga, la columna se equilibró con acetato de sodio 20 mM pH 5 durante al menos cinco CV. La columna se cargó con un cultivo celular clarificado que contenía MAb I que tenía el pH disminuido a pH 5 usando ácido acético glacial. Cuando se disminuyó el pH del cultivo celular, se observaron a menudo precipitados y se eliminaron usando una combinación de centrifugado y filtración profunda usando un Millipore Millistak® X0HC POC escala lab.

La disolución de carga se filtró en condiciones estériles antes de cargarla usando unidades de filtro Millipore Express Plus Stericup. La carga filtrada en condiciones estériles se cargó en la columna usando un tiempo de permanencia de 10 min en un esfuerzo de maximizar la capacidad de la columna (aproximadamente 45 g MAb I por L de medio), al mismo tiempo que se minimizaba la caída de presión a través de la columna. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrado para cinco CV. La columna se lavó después con tampón de acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M NaCl pH 5,0 para cinco CV. La elución de la columna se realizó con un cambio de etapa a acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,25 M pH 6,0 para al menos cinco CV. El eluato se fraccionó y las fracciones de pico se reunieron y almacenaron a 4 °C para otro uso. Entonces, se lavó la columna con acetato de sodio 20 mM, NaCl 1 M pH 6,0 para eliminar las proteínas fuertemente unidas, que se determinó que eran principalmente proteínas de células huésped (HCP). Entonces, la columna se lavó con NaOH 0,5 N para cinco CV a un caudal menor equivalente a un tiempo de permanencia de 30 minutos. A continuación se lavó la columna con cinco CV del tampón de equilibrado y se almacenó a temperatura ambiente (20-25 °C) para un uso futuro.

Ejemplo 7. Evaluación de diversos adsorbentes por tratamiento de flujo pasante de un eluato MAb capturado por afinidad

Se comparó el carbón activado en una aplicación de flujo pasante con varios medios adsorbentes diferentes comercialmente disponibles que se usan habitualmente para la purificación de proteínas que incluían químicas de intercambio aniónico (ChromaSorb™), intercambio catiónico (HiTrap SP FF, HiTrap CM FF), e interacción hidrofóbica (HiTrap Phenyl FF, HiTrap Butyl FF) para la purificación de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar que el carbón activado es único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas.

Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

En la presente memoria se usan intercambiamente carbón activado HD y HD Nuchar de forma intercambiable y se refieren a la calidad de carbón activado en polvo obtenido de MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA,

EE.UU.. Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 10 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 250 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 1 mL. Se fabricaron dispositivos de membrana de 0,2 mL ChromaSorb usando una membrana de polietileno de índice de 0,65 micras modificada con polialil amina, disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU., en dispositivos de diversos tamaños. La membrana se cortó en discos de 25 mm; Se apilaron y sellaron 5 discos en un dispositivo de polipropileno sobremoldeado del mismo tipo que los dispositivos de filtro de cápsulas desechables OptiScale 25 comercialmente disponibles en Millipore Corporation. Los dispositivos incluyen un respiradero para prevenir la falta de aire, y tienen un área efectiva de filtración de 3,5 cm² y un volumen de 0,2 mL.

Las columnas de cromatografía de 1 mL pre-rellenas HiTrap SP FF, HiTrap CM FF, HiTrap Phenyl FF (sub elevada), y HiTrap Butyl FF se adquirieron de GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EE.UU., y se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7) antes de usarse. Se ensamblaron seis trenes de purificación de flujo pasante: a) carbón activado, b) ChromaSorb, c) HiTrap SP FF, d) HiTrap CM FF, e) HiTrap Phenyl FF, y f) HiTrap Butyl FF. Posteriormente, se pasan a través de cada configuración 96 mL del eluato de Proteína A MAb I a un caudal de 0,25 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron en cuanto a proteína de células huésped (HCP), concentración IgG y Proteína A residual. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponibles de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. El análisis de Proteína A se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Meridian Life Sciences, Saco, ME, EE.UU., Kit C0Z51-188. Los resultados se resumen en la Tabla IV.

Los resultados muestran que el carbón activado eliminó la mayor cantidad de impurezas con un valor de reducción del log (LRV) de proteína de célula huésped (HCP) de 0,87. El LRV del valor HCP para el carbón activado era significativamente mayor en comparación al medio comercialmente disponible (intercambio aniónico, intercambio catiónico, interacción hidrofóbica) examinado, que tenía LRV de HCP que oscilaba de 0,19 a 0,35. La Proteína A residual de la etapa de captura de afinidad también se eliminó de forma eficaz por debajo del límite detectable por el carbón activado. El único medio comercialmente disponible que se observó que eliminaba cualquier cantidad significativa de Proteína A residual era el medio de intercambio aniónico (ChromaSorb™), que también disminuía la concentración de Proteína A residual por debajo del límite detectable. A pesar de las elevadas cantidades de impurezas eliminadas por el carbón activado todavía tenía una recuperación excelente (96%) del producto de anticuerpo monoclonal (MAb I), que era similar a las recuperaciones de producto (82-100%) observadas para los medios comercialmente disponibles que se examinaron.

Tabla IV

adsorbente de flujo pasante	MAb (mg/m L)	Recuperación MAb I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP	Proteína A (ng/mL)	Proteína A (ppm)
Sin tratar (control)	7,18	ND	869	12 ¹	ND	4,61	0,62
Carbón activado	6,88	96%	112	16	0,87	ND	ND
ChromaSorb	5,92	82%	320	54	0,35	ND	ND
HiTrap SP FF	6,09	85%	364	60	0,31	2,95	0,48
HiTrap CM FF	6,28	87%	463	74	0,22	2,72	0,43
HiTrap Phenyl FF	6,89	96%	385	56	0,33	3,21	0,47
HiTrap Butyl FF	7,21	100%	563	78	0,19	4,25	0,59
ND - No detectado							
NA - No aplicable							

Ejemplo 8. El tratamiento de empapado estático de un eluato capturado por afinidad de un MAb con carbón activado y/o medio de intercambio aniónico

El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico se examinó para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas.

Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

En la presente memoria se usan intercambiamente carbón activado RGC y RGC Nuchar de forma intercambiable y se refieren a la calidad de carbón activado en polvo obtenido de MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, EE.UU.. En un experimento representativo, una porción circular de 7 mm (5 μ L) de la membrana ChromaSorb™ y/o 10 mg de carbón activado RGC Nuchar se añadieron a un tubo centrífugo de 1,5 mL con tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7 para equilibrar el medio adsorbente. Los tubos se centrifugaron y el tampón de equilibrado sobrenadante se eliminó. Posteriormente, se añadió un volumen de 1 mL del eluato de Proteína A MAb I a un tubo centrífugo de 1,5 mL que contenía el(los) adsorbente(s) equilibrado(s). Se dejó que el medio adsorbente y el eluato interactuasen durante 18 horas a temperatura ambiente con rotación suave. Los tubos se sometieron a centrifugado y las disoluciones de sobrenadante se analizaron con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG.

El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados de uno de tales experimentos se resumen en la Tabla V.

Los resultados muestran que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de la disolución de anticuerpo monoclonal. La combinación de carbón activado y el medio de intercambio aniónico (ChromaSorb) eliminó la mayor cantidad de impurezas con una reducción del valor de reducción del log (LRV) de proteína de célula huésped (HCP) de 1,43. El carbón activado y el medio de intercambio aniónico individuales tenían LRV de HCP de 1,21 y 0,36 respectivamente. El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico tenían ambos expelentes recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal de 95% y 95% respectivamente.

Tabla V

Medio adsorbente	MAb I (mg/mL)	Recuperación MAb I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Control (nada añadido)	6,92	ND	1748	252	ND
Carbón activado	6,58	95%	102	16	1,21
ChromaSorb	6,74	97%	743	110	0,36
Carbón Activado y ChromaSorb	6,58	95%	62	9	1,43
NA - No aplicable					

Ejemplo 9. El tratamiento de empapado estático de un eluato capturado por afinidad de un MAb con carbón activado y/o un medio de intercambio aniónico

El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico se examinó para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) que contenía un anticuerpo monoclonal diferente a MAb I (referido como MAb II) para demostrar que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico proporciona un método único e inesperadamente eficaz que se puede aplicar a la purificación de una variedad de anticuerpos monoclonales diferentes.

Se preparó un segundo eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb II (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb II se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb II.

Una porción circular de 7 mm (5 μ L) de la membrana ChromaSorb™ y/o 10 mg de carbón activado RGC Nuchar se añadieron a un tubo centrífugo de 1,5 mL con tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7 para equilibrar el medio adsorbente. Los tubos se centrifugaron y el tampón de equilibrado sobrenadante se eliminó. Posteriormente, se añadió un volumen de 1 mL del eluato de Proteína A MAb II con pH ajustado a un tubo centrífugo de 1,5 mL que contenía el(los) adsorbente(s) equilibrado(s). Se dejó que el medio adsorbente y el eluato interactuasen durante 18 horas a temperatura ambiente con rotación suave. Los tubos se sometieron a centrifugado y las disoluciones de sobrenadante se analizaron con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F550), siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla VI.

Los resultados muestran que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de una disolución que contenía un segundo tipo de anticuerpo monoclonal. La combinación de carbón activado y el medio de intercambio aniónico (ChromaSorb™) eliminó la mayor cantidad de impurezas con una reducción del valor de reducción del log (LRV) de proteína de célula huésped (HCP) de 1,78. El carbón activado y el medio de intercambio aniónico individuales tenían LRV de HCP de 1,08 y 0,64 respectivamente. El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico tenían ambos buenas recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal de 95% y 87% respectivamente.

Tabla VI

Medio adsorbente	MAb (mg/mL)	II	Recuperación de MAb II	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Control (nada añadido)	18,19		ND	23418	1287	ND
Carbón activado	15,89		87%	4681	295	0,64
ChromaSorb	16,08		88%	1711	106	1,08
Carbón Activado y ChromaSorb	15,44		85%	329	21	1,78
NA - No aplicable						

Ejemplo 10. El tratamiento de empapado estático de un eluato capturado por no-afinidad de un MAb I con carbón activado y/o medio de intercambio aniónico

El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico se examinó para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por no-afinidad (intercambio catiónico) para demostrar que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas. Con relación al eluato capturado por no-afinidad, el eluato capturado por no-afinidad (intercambio catiónico) contiene diferentes tipos de impurezas a niveles significativamente mayores. La aplicación de carbón activado para la purificación de un eluato capturado por no-afinidad demuestra que este método es general y se puede aplicar a la purificación de una variedad de eluatos de proteína diferentes.

En un experimento separado, se preparó el eluato CEX MAb I parcialmente purificado como se describe en el Ejemplo 6. El eluato se diluyó por un factor de 4 con una disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7) y después se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato CEX MAb I.

Dos porciones circulares de 10 mm (19,6 μ L) de la membrana ChromaSorb™ y/o 20 mg de carbón activado RGC Nuchar se añadieron a un tubo centrífugo de 1,5 mL con tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7 para equilibrar el medio adsorbente. Los tubos se centrifugaron y el tampón de equilibrado sobrenadante se eliminó. Posteriormente, se añadió un volumen de 1 mL del eluato de CEX MAb I a un tubo centrífugo de 1,5 mL que contenía el(los) adsorbente(s) equilibrado(s). Se dejó que el medio adsorbente y el eluato interactuasen durante 18 horas a temperatura ambiente con rotación suave. Los tubos se sometieron a centrifugado y las disoluciones de sobrenadante se analizaron con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

Los resultados muestran que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico era inesperadamente eficaz en la eliminación de impurezas de una disolución de anticuerpo monoclonal que se capturó a partir de un cultivo celular usando cromatografía de no-afinidad (intercambio catiónico). El medio de captura basado en no-afinidad (intercambio catiónico) se une a más impurezas junto con el anticuerpo monoclonal que el medio de captura basado en afinidad más específico (Proteína A). Por lo tanto, el eluato capturado por no afinidad contiene diferentes tipos de impurezas a niveles significativamente mayores. La combinación de carbón activado y membrana de intercambio aniónico (ChromaSorb™) eliminó la mayor cantidad de impurezas con una reducción del valor de reducción del log (LRV) de proteína de célula huésped (HCP) de 1,45. El carbón activado y el medio de intercambio aniónico individuales tenían LRV de HCP de 1,20 y 0,55 respectivamente. El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico tenían ambos buenas recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal de 95% y 74% respectivamente.

Tabla VII

	MAB (mg/mL)	recuperación de MAB	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Referencia	3,14	ND	64,254	20,463	ND
Carbón activado	2,99	95%	17,091	5,716	0,55
ChromaSorb	2,93	93%	3,817	1,303	1,20
Carbón Activado y ChromaSorb	2,32	74%	1,676	722	1,45
NA - No aplicable					

Ejemplo 11. Tratamiento por empapado estático de un eluato capturado por afinidad de MAB I con carbón activado a diferentes valores de pH

El carbón activado se examinó para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) a diferentes Ph de la disolución para demostrar que el carbón activado es eficaz en una variedad de diferentes condiciones de la disolución.

En un experimento separado, se preparó un eluato capturado por afinidad de MAB I (Proteína A) parcialmente purificado según el Ejemplo 5. El eluato de MAB I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAB I.

El pH del eluato de Proteína A MAB I (20 mL) se ajustó a 5, 6, 7, u 8 mediante la adición de base Tris base (2 M) o ácido acético (3 M). Los eluatos resultantes de Proteína A MAB I con pH ajustado se filtraron a continuación en condiciones estériles usando una membrana Millipore Express® de 0,22 micras para eliminar cualquier turbidez. A continuación se añadió carbón activado RGC Nuchar (10 mg) a tubos centrifugos de 1,5 mL junto con tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7 para equilibrar el carbón activado. Los tubos se centrifugaron y el tampón de equilibrio sobrenadante se eliminó. A continuación se añadieron a los tubos 1 mL de los eluatos de Proteína A MAB I con pH ajustado. Se dejó que el medio adsorbente y los eluatos interactuasen durante 18 horas a temperatura ambiente con rotación suave. Los tubos se sometieron después a centrifugado y se eliminaron 0,5 mL de sobrenadante y se analizó con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiente el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla VII.

Los resultados muestran que el carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de una disolución de anticuerpo monoclonal en un intervalo amplio de pH. El valor de reducción del log (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) era muy similar para pH 6, pH 7, y pH 8, oscilando de 1,27 a 1,30 LRV de HCP. El carbón activado aún proporcionaba eliminación selectiva de impurezas a pH 5 aunque el LRV de HCP se redujo a 0,70. El carbón activado tenía excelentes recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal que oscila de 90% a 95% para todas las condiciones de pH examinadas.

Tabla VIII

pH	MAb I (mg/mL)		recuperación de MAb I	HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		LRV de HCP
	Referencia	Después A.C.		Referencia	Después A.C.	Referencia	Después A.C.	
5	7,31	6,97	95%	5,505	1,048	753	150	0,70
6	7,26	6,88	95%	1,986	101	274	15	1,27
7	7,04	6,79	96%	1,889	91	268	13	1,30
8	8,63	7,76	90%	1,556	75	180	10	1,27

Ejemplo 12. El tratamiento de flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de un MAb I con carbón activado y/o medio de intercambio aniónico

5 El carbón activado solo y en combinación con el medio de intercambio aniónico se examinó en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas en condiciones de flujo pasante usadas comúnmente para la purificación a gran escala de proteínas.

10 Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

15 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 10 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 250 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 1 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Un dispositivo de 0,2 mL ChromaSorb, fabricado como se describe anteriormente en el Ejemplo 7, también se equilibró con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Se ensamblaron subsiguientemente tres trenes de purificación. El primero consistía en un dispositivo ChromaSorb, el segundo consistía en una columna de carbón activado y el tercero consistía en una columna de carbón activado seguida de un dispositivo ChromaSorb. Se hicieron pasar 100 mL del eluato de Proteína A MAb I a través de cada montaje a un caudal de 0,25 mL/min. Se recogieron diez fracciones de 10 mL del eluato. Se analizaron las muestras reunidas de todas las diez así como las fracciones individuales con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla IX.

25 Como se representa en la Figura 16 y se resume en la Tabla IX, los resultados muestran que el tratamiento de flujo pasante del eluato capturado por afinidad con carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de la disolución de anticuerpo monoclonal. La combinación de carbón activado y membrana de intercambio aniónico (ChromaSorb™) eliminó la mayor cantidad de impurezas con una reducción del valor de reducción del log (LRV) de proteína de célula huésped (HCP) de 1,95. El carbón activado y el medio de intercambio aniónico individuales tenían LRV de HCP de 0,96 y 0,23 respectivamente. El carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio aniónico tenían ambos expelentes recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal que oscila entre 96% y 98% respectivamente.

35

Tabla IX

Tren de flujo pasante	MAB (mg/mL)	recuperación de MAb I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Sin tratar (control)	9,21	ND	6,259	679	ND
solo ChromaSorb	8,92	97%	3,538	397	0,23
Solo carbón activado	9,03	98%	1,330	148	0,96
Carbón activado seguido de ChromaSorb	8,81	96%	67	8	1,95
NA - No aplicable					

Ejemplo 13. Tratamiento por flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de MAb I con diversos medios de intercambio aniónico solos o después de tratamiento con carbón activado

5 El carbón activado se examinó solo y en combinación con una variedad de diferentes medios de intercambio aniónico comercialmente disponibles para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar que el carbón activado se puede combinar con diversos medios diferentes de intercambio aniónico. Los medios de intercambio aniónico comercialmente disponibles examinados incluían aminas primarias (ChomaSorb) y aminas cuaternarias (Sartobind Q, Mustang Q, HiTrap Q FF). Las químicas de intercambio aniónico comercialmente disponibles se examinaron soportadas en una membrana (ChomaSorb, Sartobind Q, Mustang Q) y en una resina (HiTrap Q FF).

10 Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

15 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 10 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 250 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 1 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Se fabricaron dispositivos de membrana de 3 capas, 0,26 mL Sartobind Q usando discos de membrana Sartobind Q comercialmente disponibles (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EE.UU.) (0,26 mL, 3 láminas) y la carcasa del dispositivo y los procesos usados para producir los dispositivos de 0,2 mL ChromaSorb se fabricaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 7. Las unidades de 0,18 mL Acrodisc® con membrana Mustang Q se compraron de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU. Estos dispositivos, junto con la columna pre-rellena de 1 mL HiTrap Q FF (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EE.UU.) y el dispositivo de 0,2 mL ChromaSorb, se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7).

20 Se ensamblaron nueve trenes de purificación de flujo pasante: a) carbón activado, b) ChromaSorb, c) carbón activado seguido de ChromaSorb, d) Sartobind Q, e) carbón activado seguido de Sartobind Q, f) Mustang Q, g) carbón activado seguido de Mustang Q, h) HiTrap Q FF, i) carbón activado seguido de HiTrap Q FF. 96 mL del eluato de Proteína A MAb I se hicieron pasar a continuación a través de cada montaje a un caudal de 0,25 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron con relación a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiente el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla X.

25 Los resultados muestran que el tratamiento de flujo pasante de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) con la combinación de carbón activado con una variedad de medios de intercambio aniónico diferentes esta inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas. El valor de reducción del log (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) era 0,91 para el carbón activado solo. Los diferentes medios de intercambio aniónico comercialmente disponibles solos tenían LRV de HCP muy similares que oscilaban de 0,17 a 0,23. La combinación de carbón activado seguida por los diferentes medios de intercambio aniónico comercialmente disponibles tenía LRV de HCP mucho mayores que oscilaban de 1,70 a 1,93. La combinación de carbón activado seguida de los diferentes medios de intercambio aniónico tenía excelentes recuperaciones del anticuerpo monoclonal que oscilaban de 96% a 97%. Los datos demostraban que el carbón activado es inesperadamente eficaz para la purificación de anticuerpos en combinación con una variedad de diferentes medios de intercambio aniónico

comercialmente disponibles que incluyen aminas primarias (ChomaSorb™) y aminas cuaternarias (Sartobind Q, Mustang Q, HiTrap Q FF). La combinación de carbón activado era altamente eficaz en combinación con químicas de intercambio aniónico comercialmente disponibles que se soportaron en una membrana (ChomaSorb, Sartobind Q, Mustang Q) y en una resina (HiTrap Q FF).

5 **Tabla X**

Medio AEX	MAb I (mg/mL)		recuperación de MAb I		HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		LRV de HCP	
	AEX solo	AEX después A.C.	AEX solo	AEX después A.C.	AEX solo	AEX después A.C.	AEX solo	AEX después A.C.	AEX solo	AEX después A.C.
no medio AEX	ND	8,82	ND	96%	5,701	738	618	84	ND	0,91
ChromaSorb	9,20	8,89	100%	96%	3,660	70	398	8	0,23	1,93
Sartobind Q	9,26	8,99	100%	97%	4,103	98	443	11	0,19	1,80
Mustang Q	9,17	8,86	99%	96%	4,001	120	436	14	0,19	1,70
Q Fast Flow	9,20	8,76	100%	95%	4,245	81	462	9	0,17	1,86
NA - No aplicable										

Ejemplo 14. Tratamiento de flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de MAb I con carbón activado seguido de medios de intercambio aniónico con medios de intercambio aniónico seguidos de carbón activado

10 El orden de carbón activado y medio de intercambio aniónico para la eliminación de impurezas por flujo pasante de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) se examinó para demostrar que el orden de los dos adsorbentes ejercía inesperadamente influencia sobre su eficacia. El experimento ilustra que la colocación del carbón activado antes del medio de intercambio aniónico es importante para maximizar la capacidad de la combinación de adsorbentes para eliminar las impurezas de disoluciones proteicas.

15 Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

20 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 10 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 250 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 1 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Un dispositivo de membrana de 0,2 mL ChromaSorb, fabricado como se describe anteriormente en el Ejemplo 7, también se equilibró con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Se ensamblaron dos trenes de flujo pasante. El primero tenía la columna de carbón activado seguida del dispositivo de membrana ChromaSorb, mientras que el segundo tenía el orden inverso con el dispositivo de membrana ChromaSorb seguido de la columna de carbón activado. 96 mL del eluato de Proteína A MAb I se hicieron pasar a través de cada montaje a un caudal de 0,25 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron con relación a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XI.

35 Los resultados muestran el resultado inesperado de que el orden del carbón activado y un medio de intercambio aniónico (ChromaSorb) es importante para la eficacia de la purificación de flujo pasante de un eluato capturado por afinidad (Proteína A). El valor de reducción del log (LRV) de la proteína de la célula huésped (HCP) era 1,87 cuando se colocaba el carbón activado en frente del medio de intercambio aniónico. El LRV de HCP se redujo a 1,38 cuando el medio de intercambio aniónico se colocó en frente del carbón activado. El orden el carbón activado y el medio de intercambio aniónico no tenía influencia en la recuperación del anticuerpo, que era del 97% para ambos órdenes de

los adsorbentes. Los resultados revelan una importante comprensión de que colocar el carbón activado antes del medio de intercambio aniónico es importante para maximizar la efectividad de la combinación de dos adsorbentes para eliminar impurezas de disoluciones proteicas.

Tabla XI

Tren de flujo pasante	MAb (mg/mL)	recuperación de MAb I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Sin tratar (control)	9,24	ND	4,986	540	ND
ChromaSorb seguido de carbón activado	8,95	97%	202	23	1,38
Carbón activado seguido de ChromaSorb	8,95	97%	65	7	1,87
NA - No aplicable					

5

Ejemplo 15. Tratamiento por flujo pasante de un eluato capturado por no-afinidad de MAb I con carbón activado

Se examinó el carbón activado en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por no-afinidad (Proteína A) para demostrar que el carbón activado proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas. Con relación a un eluato capturado por no-afinidad, el eluato capturado por no-afinidad (intercambio catiónico) contiene diferentes tipos de impurezas a niveles significativamente mayores. La aplicación de carbón activado para la purificación de un eluato capturado por no-afinidad demuestra que este método es general y se puede aplicar a la purificación de una variedad de diferentes disoluciones proteicas.

Se preparó un eluato parcialmente purificado de CEX MAb I como se escribe en el Ejemplo 6. El eluato se diluyó por un factor de 4 con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). El eluato diluido de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 6 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato CEX MAb I.

La columna de cromatografía Omnifit (diámetro de 10 mm, longitud de 100 mm) se cargó con 250 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 1 mL. La columna se equilibró con una disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7).

A continuación se hicieron pasar 70 mL del eluato CEX MAb I a través de la columna de carbón activado a un caudal de 0,25 mL/min. Se recogieron siete fracciones de 10 mL del eluato. Se analizaron las muestras reunidas de todas las siete así como las fracciones individuales con relación a la concentración de proteína de célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., número de catálogo F550, siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XI.

Como se representa en la Figura 16 y se resume en la Tabla XII a continuación, los resultados muestran que la purificación por flujo pasante con carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por no-afinidad (Proteína A). El medio de captura basado en no-afinidad (intercambio catiónico) se une a más impurezas junto con el anticuerpo monoclonal que el medio de captura basado en afinidad más específico (Proteína A). Por lo tanto, el eluato capturado por no afinidad contiene diferentes tipos de impurezas a niveles significativamente mayores. El carbón activado proporcionaba un valor de reducción de log (LRV) de proteína de la célula huésped (HCP) de 0,76 y tenía 89% de recuperación del producto de anticuerpo monoclonal. Estos resultados sugieren que se puede usar carbón activado para eliminar impurezas de una variedad de diferentes disoluciones proteicas.

Tabla XII

Tren de flujo pasante	MAB I (mg/mL)	recuperación de MAB I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Sin tratar (control)	3,13	ND	66,269	21,172	ND
Columna de carbón activado	2,79	89%	10,343	3,707	0,76
NA - No aplicable					

Ejemplo 16. Purificación por flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de MAB I con una columna rellena de carbón activado y un dispositivo de celulosa-carbón activado

5 Se examinó el carbón activado relleno en una columna o mezclado en una lámina de celulosa en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar que el carbón activado proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas en diferentes formatos.

10 Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAB I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAB I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAB I.

15 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 15 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 600 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 2.4 mL. El medio de carbón activado-lámina de celulosa impregnada, comercialmente disponible en un dispositivo Millistak+ Pod CR de Millipore Corporation, Billerica, MA, se colocó en un dispositivo de jeringa de polipropileno sobremoldeado, con 25 mm de área de filtración interna, 4,6 mL de volumen de lecho, equipado con conectores Luer para entrada y salida.

20 La columna y el dispositivo de carbón activado-celulosa se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Se ensamblaron dos trenes de flujo pasante. El primero tenía la columna de carbón activado mientras que el segundo tenía el dispositivo carbón activado-celulosa. 315 mL del eluato de Proteína A MAB I se hicieron pasar a continuación a través de cada montaje a un caudal de 0,75 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron con relación a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F550), siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XIII.

30 Los resultados muestran que la purificación por flujo pasante con carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) cuando se rellenaba en una columna o se mezclaba en una lámina de celulosa. El carbón activado relleno en una columna o mezclado en una lámina de celulosa tenían ambos valores de reducción de log (LRV) de proteína de la célula huésped (HCP) muy similares de 0,95 y 0,97 respectivamente. También tenían recuperaciones muy similares de producto de anticuerpo monoclonal de 91 % para la columna y 87% para la lámina de celulosa. Estos resultados sugieren que el carbón activado se puede usar de forma eficaz para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas cuando se mezcla en una lámina de celulosa.

Tabla XIII

Tren de flujo pasante	MAB (mg/mL)	I recuperación de MAB I	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Sin tratar (control)	9,79	ND	6,229	642	ND
Columna de carbón activado Nuchar	8,92	91%	682	76	0,95
dispositivo de carbón activado-celulosa	8,53	87%	620	73	0,97
NA - No aplicable					

Ejemplo 17. Purificación por flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de MAb I con otros dos tipos de carbón activado

Se examinaron otros dos tipos de carbón activado comercialmente disponibles en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) para demostrar el resultado inesperado de que se pueden usar una variedad de diferentes carbones activados para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas.

Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

Se cargaron columnas de cromatografía Glass Omnifit (5 mm de diámetro, 100 mm de longitud) con 125 mg de carbón activado Chemviron Pulsorb PGC (Chemviron Carbon, Feluy, Bélgica) o carbón activado Norit A Supra USP (Norit Americas Inc., Marshall, Texas, EE.UU.) en suspensión en agua para dar un volumen de columna rellena de 0,24 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). Se ensamblaron dos trenes de flujo pasante. El primero tenía la columna de carbón activado Chemviron Pulsorb PGC mientras que el segundo tenía la columna de carbón activado Norit A Supra USP. 96 mL del eluato de Proteína A MAb I se hicieron pasar a través de cada montaje a un caudal de 0,25 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron con relación a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F550), siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XIV.

Los resultados muestran que la purificación por flujo pasante con otros dos tipos de carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A). La Chemviron Pulsorb PSG y Norit A Supra USP ambos eliminaban impurezas con valores de reducción de log (LRV) de proteína de la célula huésped (HCP) de 0,40 y 0,48 respectivamente. También tenían recuperaciones excelentes del producto de anticuerpo monoclonal de 100% para Chemviron Pulsorb PSG y 100% para Norit A Supra USP. Estos resultados sugieren que se pueden usar diversos tipos diferentes de carbón activado para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas.

Tabla XIV

Tren de flujo pasante	MAb I (mg/mL)	recuperación de MAb	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	LRV de HCP
Sin tratar (control)	7,15	ND	1026	144	ND
Chemviron Pulsorb PGC	7,18	100%	409	57	0,40
Norit A Supra USP	7,17	100%	341	48	0,48
NA - No aplicable					

Ejemplo 18. Purificación por flujo pasante de un eluato capturado por afinidad de MAb I en presencia de diferentes sales tampón

Se examinó el carbón activado en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) con diversas sales diferentes añadidas para demostrar que el carbón activado proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas en presencia de muchas sales diferentes. La investigación ilustra que este método es general y se puede aplicar a la purificación de proteínas en una variedad de sales tampón diferentes.

Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. El eluato de MAb I se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I.

A una parte de 50 mL del eluato de Proteína A MAb I, se añadieron 10 mL de disolución acuosa que contenía 300 mM de diversas sales, donde las sales eran sulfato de amonio, sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético deshidratada (EDTA), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), cloruro de sodio, citrato de trisodio deshidratado,

fosfato de sodio dibásico heptahidratado y cristales Trizma® Pre-set, pH 7,0 (Tris-HCl).

Se usó como control una disolución diluida con 10 mL de agua. El pH del eluato de Proteína A con adición de sal se ajustó a de nuevo a pH 7 con base Tris 2 M o ácido acético 3 M. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I con sal añadida.

5 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 5 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 125 mg de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 0.5 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). 40 mL del eluato de Proteína A MAb I con sal añadida se hace pasar a través de las columnas de carbón activado a un caudal de 0,125 mL/min. Después de pasar a través de las columnas, las disoluciones se analizaron con relación a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F550), siguiendo el protocolo del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XV.

15 Los resultados muestran que la purificación por flujo pasante de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) con carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas en presencia de una variedad de diferentes aditivos de sales. Las impurezas eliminadas con carbón activado en presencia de todas las sales añadidas con valores de reducción de log (LRV) de proteína de la célula huésped (HCP) oscilaban de 0,63 a 1,00. También tenían excelentes recuperaciones del producto de anticuerpo monoclonal que oscilaba entre 92% a 96%. Estos resultados sugieren que el carbón activado se puede usar para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas en una variedad de diferentes tampones salinos.

Tabla XV

sal añadida	MAb I (mg/mL)		recuperación de MAb I	HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		LRV de HCP
	antes A.C.	Después A.C.		antes A.C.	Después A.C.	antes A.C.	Después A.C.	
solo agua (control)	7,33	6,86	94%	987	76	135	11	1,08
Tris	6,99	6,68	96%	1,194	119	171	18	0,98
Cloruro sódico	6,58	6,33	96%	1,151	111	175	17	1,00
sulfato de amonio	6,93	6,66	96%	1,359	177	196	27	0,87
fosfato de disodio	6,92	6,59	95%	1,293	153	187	23	0,90
citrato de sodio	6,53	6,03	92%	1,351	241	207	40	0,71
EDTA	6,71	6,39	95%	1,304	293	194	46	0,63
MES	6,90	6,54	94%	1,110	132	161	20	0,90

Ejemplo 19. Purificación por flujo pasante de eluato de Proteína A a pH 5 y pH 7

25 Se examinó el carbón activado en una aplicación de flujo pasante para la eliminación de impurezas de un eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) a dos condiciones de pH diferentes para demostrar que el carbón activado proporciona un método único e inesperadamente eficaz para la eliminación por flujo pasante de impurezas a diferentes condiciones de pH de la disolución. La investigación ilustra que este método es general y se puede aplicar a la purificación de proteínas en diferentes condiciones de pH.

30 Se preparó un eluato capturado por afinidad parcialmente purificado MAb I (Proteína A) según el Ejemplo 5. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I pH 5.

Una parte del eluato de MAb I preparado según el Ejemplo 5 se ajustó de aproximadamente pH 5 a pH 7 con base

Tris (2 M) y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 micras Millipore Express Plus Stericup. La disolución es referida en la presente memoria como el eluato Proteína A MAb I pH 7.

5 Las columnas de cromatografía Omnifit (diámetro de 15 mm, longitud de 100 mm) se cargaron con 1,25 g de carbón activado HD Nuchar en suspensión en agua para proporcionar un volumen de columna rellena de 5 mL. Las columnas se equilibraron con disolución tampón (tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 7). A continuación se hacen pasar a través de la columna activada 500 mL del eluato de Proteína A MAb I de pH 5 o el eluato de Proteína A MAb I de pH 7 a un caudal de 1,25 mL/min. Después de pasar a través de los trenes de purificación, las disoluciones se analizaron con respecto a la concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F550), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados se resumen en la Tabla XVI.

15 Los resultados muestran que la purificación por flujo pasante de eluato de anticuerpo monoclonal capturado por afinidad (Proteína A) con carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación de impurezas tanto a pH 5 como a pH 7. El carbón activado eliminaba impurezas con valores de reducción del log (LRV) de proteína de la célula huésped (HCP) de 0,85 a pH 5 y 1,15 a pH 7. El carbón activado también tenía excelentes recuperaciones del anticuerpo monoclonal con 97% a pH 5 y 101% a pH 7. Estos resultados sugieren que se pueden usar diversos tipos diferentes de carbón activado para la eliminación de impurezas de disoluciones proteicas a diferentes condiciones de pH.

20 **Tabla XVI**

pH	MAb I (mg/mL)		recuperación de MAb I	HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		LRV de HCP
	antes A.C.	Después A.C.		antes A.C.	Después A.C.	antes A.C.	Después A.C.	
5	9,22	8,98	97%	3,429	486	371	54	0,85
7	8,61	8,68	101%	1,774	124	206	14	1,15

Ejemplo 20. La purificación por flujo pasante de un eluato de Proteína A preparado usando cromatografía continua.

25 Este experimento representativo demuestra que el carbón activado y un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico se puede usar para purificar un eluato de Proteína A obtenido usando cromatografía multicolumna continua (CMC).

30 En este ejemplo, se purifica un anticuerpo monoclonal (MAb II) usando un método de cromatografía multicolumna continua (CMC) de tres columnas usando resina Proteína A Prosep® Ultra Plus, como se describe en la Solicitud de Patente Europea No. EP12002828.7, en tramitación con la presente. El eluato de Proteína se reúne y se procesa a través de un dispositivo de carbón activado seguido de un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (es decir, ChromaSorb™), como se describe en el Ejemplo 12.

Como se demuestra en la Figura 18, se obtiene la purificación exitosa del anticuerpo monoclonal, media por la reducción de la concentración de HCP por debajo de 10 ppm, cuando se usa una combinación de carbón activado y un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico.

35 **Ejemplo 21. Conectando varias etapas de eliminación de impurezas por flujo pasante**

En este experimento representativo, se demuestra la viabilidad de conectar varias etapas de eliminación de impurezas en modo de flujo pasante para operar como una etapa de proceso o de procedimiento unitaria única, al mismo tiempo que se cumplen los objetivos de pureza y rendimiento.

40 En este ejemplo, están conectados dispositivos individuales, es decir, un dispositivo de carbón activado, un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (es decir, ChromaSorb™), un dispositivo de intercambio catiónico y un dispositivo de filtración de virus (es decir, Viresolve® Pro) para operar en modo de flujo pasante. Además, están posicionados un tanque de compensación y/o un mezclador en línea estático entre los dispositivos de cromatografía de intercambio aniónico y de cromatografía de intercambio catiónico, para conseguir un cambio del pH. Por último, se posiciona un filtro opcional corriente arriba del dispositivo de carbón activado, en caso de que la 45 nuestra que se va a purificar esté turbia.

La Figura 19 muestra una representación esquemática de la instalación experimental para realizar una etapa del proceso de purificación de flujo pasante, que incluye los dispositivos descritos siguientes.

Adicionalmente, también se pueden incluir en una instalación las bombas, válvulas, sensores, etc.

Todos los dispositivos se pueden humedecer individualmente en una estación diferente, y ensamblarse después.

- 5 Los dispositivos se humedecen y se pre-tratan según el protocolo del fabricante. Brevemente, el filtro profundo (calidad A1HC) se sobrealimenta con 100 L/m² de agua seguido de 5 volúmenes de tampón de equilibrado 1 (EB1; tampón de elución de Proteína A ajustado a pH 7,5 con Tris-base 1 M, pH 11). Se rellenan 2,5 mL de carbón activado en una columna de 2,5 cm Omnifit como se describe en el Ejemplo 12, para producir la carga del anticuerpo de 0,55 kg/L. La columna se sobrealimenta con 10 CV de agua, y después se equilibra con EB1 hasta que el pH se estabiliza a pH 7,5. Dos dispositivos ChromaSorb (0,2 y 0,12 mL) se conectan en serie para conseguir una carga de 4,3 kg/L. Los dispositivos se humedecen con agua a 12,5 CV/min durante al menos 10 min, seguido de 5 DV (Volúmenes del Dispositivo) de EB1. Se usan un mezclador estático helicoidal desechable (Koflo Corporation, Cary, IL) con 12 elementos para realizar los ajustes de pH en línea. Se conectan en paralelo dos dispositivos de intercambio catiónico de 1,2 mL para la eliminación de los agregados. La carga MAb en los dispositivos CEX es de aproximadamente 570 mg/mL. Estos dispositivos se humedecen con 10 DV de agua, seguido de 5 DV de tampón de equilibrado 2 (EB2; EB1 Ajustado a pH 5,0 usando ácido acético 1 M). Los dispositivos se tratan adicionalmente con 5 DV (volúmenes del dispositivo) de EB2 + NaCl 1 M, y después se equilibran con 5 DV de EB2. Un dispositivo de A 3,1 cm² VireSolve® Pro se humidifica con agua presurizada a 30 psi durante al menos 10 min. El caudal se monitoriza a continuación cada minuto hasta que el caudal permanece constante durante 3 minutos consecutivos.
- 10 Después de que todos los dispositivos se humedecen y equilibran, se conectan como se muestra en la Figura 19. EB1 se hace pasar a través de todo el sistema hasta que todas las lecturas de presión y todas las lecturas de pH se estabilizan. Después del equilibrado, la alimentación se hace pasar a través del tren de flujo pasante. Durante el paso, las muestras se recogen antes del tanque de compensación y después de Viresolve® Pro para monitorizar la concentración IgG y los niveles de impurezas (HCP, ADN, PrA lixiviado y agregados). Después de que se procesa la alimentación, el sistema se sobrealimenta con 3 volúmenes muertos de EB1 para recuperar la proteína en los dispositivos y en las tuberías.
- 15
- 20
- 25

La alimentación para el proceso de flujo pasante conectado es eluato de proteína A de MAb II, producido en un proceso de proteína A discontinuo. El nivel natural de agregados en este MAb no excede 1%, así que se desarrolló un procedimiento especial para aumentar el nivel de agregados. El pH de la disolución pH se eleva a 11 con NaOH acuoso NaOH, con agitación suave, y se mantuvo durante 1 hora. A continuación el pH se baja lentamente a pH 5 con HCl acuoso con agitación suave. El ciclo de pH se repite 4 veces más. El nivel final de agregados es de aproximadamente 5%, consistiendo la mayor parte en dímeros y trímeros de MAb medidos por SEC. A continuación se dializa la alimentación en tampón Tris-HCl, pH 7,5, conductividad de aproximadamente 3 mS/cm.

30

- 35 La cantidad de alimentación de MAb procesada para este ensayo es 102 mL de 13,5 mg/mL de MAb a un caudal de 0,6 mL/min.

El punto final HCP como una función del tiempo después de ChromaSorb™ está por debajo del límite superior de 10 ppm (Figura 20). Los agregados son reducidos de 5% a 1,1% por el dispositivo CEX (Figura 21). El rendimiento de MAb II del proceso conectado es 92%. La producción en el dispositivo Viresolve® Pro es >3,7 kg/m².

- 40 De acuerdo con esto, el ejemplo anterior demuestra que se pueden conectar diversos dispositivos para operar en un modo de flujo pasante satisfactoriamente, alcanzando de ese modo la pureza deseada del producto y los rendimientos deseados.

Ejemplo 22. Etapa del proceso de purificación de flujo pasante conectora con etapa de captura de cromatografía de elución y unión continua.

- 45 En este experimento representativo, un proceso de purificación de flujo pasante, como se describe en la presente memoria, se unió directamente a un proceso de captura de cromatografía unión y elución, que precede la purificación de flujo pasante.

- 50 En este ejemplo, se produce un anticuerpo monoclonal basado en CHO (MABII) en un biorreactor de alimentación discontinua. Se pone en contacto un total de 7 L de cultivo celular con una disolución de polímero de respuesta de estímulos para obtener una concentración de polímero de respuesta de estímulos final de 0,2 % v/v. Se deja que el cultivo celular se mezcle durante aproximadamente 10 minutos. Se añaden 175 mL de disolución K₂HPO₄ 2M y se deja que se mezcle durante 10 minutos más. El pH se eleva después a 7,0 con base tris 2 M y se deja que se mezcle durante 15 minutos. A continuación se centrifuga la disolución en alícuotas de 2 L a 4,500 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se decanta y se retiene. Los sólidos se separan. El sobrenadante del cultivo celular se vierte y después se mezcla con NaCl 5 M en una proporción 1:10 en modo discontinuo con agitación continua. La conductividad final de la disolución se mide en este punto y es a 55 ± 5 mS/cm. La disolución resultante de NaCl con concentración más elevada se filtra en condiciones estériles a través de un filtro Express de 0,22 µm. La disolución filtrada estéril es el material de carga para la cromatografía de Proteína A.
- 55

La etapa de captura de proteína A consiste en dos columnas de proteína A que operan con un método en un Akta

Explorer 100. Las columnas de proteína A tienen 10 mL de medio de proteína A ProSep® Ultra Plus relleno en columnas de cromatografía de 1,6 cm de DI Vantage-L (EMD Millipore) a alturas de lecho de 10,25 y 10,85 cm. Las columnas se equilibran con 1X TBS, NaCl 0,5 M para 5 volúmenes de columna, CV (todos los volúmenes de columna se basan en la columna más pequeña). A través del ensayo, el caudal de carga se fija para tener un tiempo de residencia de aproximadamente un minuto. Durante la carga inicial, ambas columnas se colocan en serie, donde el efluente de la columna primaria se carga directamente en la columna secundaria hasta que se alcanza un volumen de carga específico. Después de que se pasa sobre las columnas un volumen de carga específico, se para la alimentación y se pasan dos CV del tampón de equilibrado a través de la columna primaria a la columna secundaria. La columna primaria se posiciona a continuación para sufrir un lavado, elución, limpieza y reequilibrado, mientras que la columna secundaria se carga como la columna primaria. Después del reequilibrado de la primera columna, esa columna se mueve a la posición secundaria para residir en serie con la ahora columna primaria. Esta serie de sucesos se repite con cada columna tomado la posición primaria después de que la columna en posición primaria original se carga a un volumen fijado. Cada columna se carga un total de siete veces. Las eluciones para cada columna se recogen con un recogedor de fracciones, usando un desencadenante UV para controlar el tiempo de comienzo de la elución y recogido a un volumen constante de aproximadamente 3,5 CV.

El tren de purificación de flujo pasante consiste en seis dispositivos principales: filtro profundo opcional (para precipitar lo eliminado después del ajuste de pH a 7,5); carbón activado; ChromaSorb™; mezclador estático y/o tanque de compensación para el ajuste del pH en línea; dispositivo de intercambio catiónico de flujo pasante para la eliminación de agregados (dispositivo CEX); y dispositivo de filtración de virus (es decir, Viresolve® Pro).

La Figura 19 ilustra el orden en que se conectan estos dispositivos.

Todos los dispositivos se humedecen individualmente en una estación diferentes, y después de ensamblan como se muestra en la Figura 19. Los dispositivos se humedecen y se pretratan según el protocolo del fabricante como se describe antes. Brevemente, el filtro profundo (AHC) se sobrealimenta con 100 L/m² de agua seguido de 5 volúmenes de tampón de equilibrado 1 (EB1; tampón de elución de PrA ajustado a pH 7,5 con Tris-base 1 M, pH 11). 10 mL de carbón activado se rellenan en una columna Omnifit de 2,5 cm como se describe en el Ejemplo 12. La columna se sobrealimenta con 10 CV de agua, y después se equilibra con EB1 hasta que el pH se estabiliza a pH 7,5. 1,2 mL de membrana ChromaSorb (7 capas) se amontonan en un dispositivo de 47 mm de diámetro Swinex. El dispositivo se humedece con agua a 12,5 CV/min durante al menos 10 min, seguido de 5 volúmenes de dispositivo (DV) de EB1.1 Se usan un mezclador estático helicoidal desechable (Koflo Corporation, Cary, IL) con 12 elementos para realizar los ajustes de pH en línea. Un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico de 3 capas (0,12 mL de volumen de membrana) se humedece con 10 DV de agua, seguido de 5 DV de tampón de equilibrado 2 (EB2: EB1 Ajustado a pH 5,0 usando ácido acético 1 M). El dispositivo se ajusta adicionalmente con 5 DV de EB2 + NaCl 1M, y después de equilibra con 5 DV de EB2. Un dispositivo de filtración de 3,1 cm² Viresolve® Pro virus se humedece con agua presurizada a 30 psi durante al menos 10 minutos. El caudal se monitoriza después cada minuto hasta que el caudal permanece constante durante 3 minutos consecutivos. Después de que todos los dispositivos se humedecen y equilibran, se conectan como se muestra en la Figura 19. EB1 se hace pasar a través de todo el sistema hasta que todas las lecturas de presión y todas las lecturas de pH se estabilizan. Después del equilibrado, la alimentación (elución de PrA ajustada a pH 7,5) se hace pasar a través del tren de purificación de flujo pasante. Durante el paso, las muestras se recogen antes del tanque de compensación y después de Viresolve® Pro para monitorizar la concentración IgG y los niveles de impurezas (HCP, ADN, PrA lixiviado y agregados). Después de que se procesa la alimentación, el sistema se sobrealimenta con 3 volúmenes muertos de EB 1 para recuperar la proteína en los dispositivos y en las tuberías.

La Figura 22 muestra las lecturas de presión antes de la filtración profunda, carbón activado y ViresolvePro. La presión en el filtro profundo permanece sin cambiar durante la mayor parte del ensayo, pero aumenta hacia el final sugiriendo algo de precipitación de las fracciones de alimentación de elución de proteína A hacia el final del ensayo de Proteína A. La columna de carbón activado permanece bastante protegida de cualquier precipitado debido al filtro profundo aguas arriba del carbón activado. La presión ViresolvePro aumenta despacio con el tiempo, pero está muy por debajo del límite de operación máximo (50 psi).

El HCP final en el conjunto de fracciones ViresolvePro es < 1 ppm (Tabla XVI). La Proteína A lixiviada media en las fracciones de elución es de 32 ppm. La Proteína A lixiviada en el conjunto de fracciones Viresolve® Pro es 4 ppm. Los agregados se reducen de 1% a 0,4%. La tabla XVII a continuación representa los resultados de un experimento para investigar el comportamiento de la purificación de flujo pasante cuando se conecta con una etapa de proceso de cromatografía de unión y elución continua.

Tabla XVII

Rendimiento de la Purificación de Flujo Pasante (%)	97.8%
HCP medio de todas las eluciones PrA al conjunto de fracciones ViresolvePro (ppm)	172 → 1,75
Agregados en el conjunto de fracciones ViresolvePro (%)	1 → 0,4%
PrA lixiviada en el conjunto de fracciones ViresolvePro (ppm)	32 → 4
Producción de ViresolvePro (kg/m ²)	>6,1
Factor de dilución post-Proteína A	1,15x

Ejemplo 23. Eliminación de una impureza de un componente de cultivo celular usando carbón activado.

5 En este experimento representativo, se demuestra que las impurezas potenciales del cultivo celular que pueden persistir durante la etapa de captura de afinidad de Proteína A son eliminadas por el carbón activado.

10 Un componente común del medio de cultivo celular, la insulina, un estimulador del crecimiento de las células mamíferas, está presente típicamente en el medio de cultivo celular en concentraciones de 1-20 mg/L. La Insulina Humana Recombinante (Incelligent AF de EMD Millipore Corp.) se disuelve en tampón Tris 50mM pH 7,0 a 1 mg/mL, se añaden anticuerpo monoclonal MAb II a una concentración de 7g/L. Se rellena una columna de vidrio Omnifit con carbón activado HD Nuchar. La disolución se hace fluir a través de la columna a una velocidad constante de 0,25 CV/min, a una carga de MAb II total de 1kg/L. El conjunto de fracciones de flujo pasante se analiza para determinar la concentración de insulina y anticuerpos. Para el análisis, se usó un sistema Agilent HPLC equipado con una columna HC18 (*Cadenza*); disolvente A: 0,1% TFA en agua; disolvente B 0,1 % TFA en Acetonitrilo; Se usó un gradiente optimizado de 5%-30% B durante 15 minutos para detectar la insulina mediante absorbancia UV A214. 15 Primero, se creó una curva de calibración usando disoluciones estándar de insulina en presencia de anticuerpo. No se ha detectado insulina en el efluente de la columna de carbón activado, lo que indicaba que el carbón activado tenía capacidad para la insulina en presencia de MAb, en exceso de 240 mg/g.

Ejemplo 24. Eliminación de impurezas de flujo pasante de una disolución turbia de eluato capturado por afinidad de MAb II con medio celulósico de carbón activado

20 En este experimento representativo, se ha demostrado que el carbón activado es único e inesperadamente eficaz para la eliminación de HCP derivado de alimentaciones microbianas. Una disolución de lisado de *E. coli* se mezcló con anticuerpo monoclonal mAb a 1,5 mg/mL. La alimentación mezclada se trató con carbón activado relleno en una columna en condiciones de flujo pasante.

25 Las células de un cultivo de *E. coli* se recuperaron por centrifugado. El sobrenadante se separó por decantación y el pélet celular remanente se suspendió en un tampón de lisis (Tris 25 mM, EDTA 0,1 mM a pH 7) mediante agitación y sacudidas vigorosas. Después se añadió una porción de 0,4 mL de una disolución madre de PMSF 100 mM en etanol. La suspensión se separó en fracciones (~100 mL cada una) y se sometió a sonicación con 3 s de encendido y 4 s de apagado durante 5 min. Después de la sonicación el material se reunió y se almacenó a - 80 grados durante 48 horas. Después la disolución se descongeló y centrifugó a 4.500 x g durante 2 horas para eliminar las células lisadas. El sobrenadante se filtró con una membrana Stericup-HV de 0,45 µm Durapore (1000 mL, número de catálogo: SCHVU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). Después se filtró a través de una membrana Stericup-GP 0,22 µm Millipore Express PLUS (1000 mL, número de catálogo: SCGPU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). El lisado filtrado se combinó después con 7,5 mL de 10 mg/mL de una disolución de mAb para proporcionar una disolución mezclada con 1,5 mL del mAb. El pH de la disolución medido era 7,7.

35 Una columna de cromatografía de vidrio Omnifit (diámetro 10 mm, longitud 100 mm) se cargó con 250 mg de carbón activado Nuchar HD (MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, EE.UU.) en suspensión en agua para dar un volumen de columna rellena de 1 mL. La columna se equilibró con tampón Tris 25 mM a pH 7. Después 42 mL del lisado de *E coli* mezclado con mAb se hizo pasara través de la columna de carbón activado a un caudal de 0,25 mL/min dando un tiempo de residencia de 4 minutos en el carbón activado. El control y una muestra del conjunto de fracciones se enviaron para análisis de concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. 40

El análisis HCP se realizó usando un kit *E. Coli* HCP ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F410), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A. Los resultados muestran que el carbón activado era inesperadamente eficaz para la eliminación selectiva

de HCP derivado de una alimentación microbiana. La concentración de HCP en el lisado se redujo de 206.000 ng/mL (133.00 ppm) a 119.000 ng/mL (77.800 ppm) mientras que la recuperación del mAb era 99% comenzando a una concentración de 1,55 g/L y recuperado a 1,53 g/L. Este ejemplo demuestra que el carbón activado se puede usar para eliminar HCP de células no mamíferas.

5 Ejemplo 25. Eliminación de impurezas de una disolución turbia de eluato capturado por afinidad de MAbs II con medio de carbón activado-celulosa y un medio de intercambio aniónico

En este experimento, se demostró que el carbón activado solo y en combinación con un medio de intercambio iónico es único e inesperadamente eficaz para la eliminación de HCP derivado de alimentaciones microbianas después de una etapa de captura.

10 Una disolución de lisado de *E. coli* se mezcló con anticuerpo monoclonal mAb a 1,5 mg/mL y después se capturó con cromatografía de Proteína A. La alimentación capturada se trató con carbón activado relleno en una columna en condiciones de flujo pasante y después por una membrana ChromaSorb™ AEX.

15 Las células de un cultivo de *E. coli* se recuperaron por centrifugado. El sobrenadante se separó por decantación y el pélet celular remanente se suspendió en un tampón de lisis (Tris 25 mM, EDTA 0,1 mM a pH 7) mediante agitación y sacudidas vigorosas. Después se añadió una porción de 0,4 mL de una disolución madre de PMSF 100 mM en etanol. La suspensión se separó en fracciones (~100 mL cada una) y se sometió a sonicación con 3 s de encendido y 4 s de apagado durante 5 min. Después de la sonicación el material se reunió y se almacenó a - 80 grados durante 48 horas. Después la disolución se descongeló y centrifugó a 4.500 x g durante 2 horas para eliminar las células lisadas. El sobrenadante se filtró con una membrana Stericup-HV de 0,45 µm Durapore (1000 mL, número de catálogo: SCHVU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). Después se filtró a través de una membrana Stericup-GP 0,22 µm Millipore Express PLUS (1000 mL, número de catálogo: SCGPU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). El lisado filtrado se combinó después con 7,5 mL de 10 mg/mL de una disolución de mAb para proporcionar una disolución mezclada con 1,5 mL del mAb. El pH de la disolución medido era 7,7. El mAb en el lisado mezclado se capturó después con cromatografía de Proteína A. Después se eluyeron 30 mL del mAb capturado a un pH bajo. El pH de elución se elevó de 3-4 a 7 mediante la adición gota a gota de Tris 1M y después se filtró a través de una membrana Stericup-GP 0,22 µm Millipore Express PLUS (250 mL, número de catálogo: SCGPU02RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). 1 mL de la elución con pH ajustado se dejó a un lado para análisis.

30 Una columna de cromatografía de vidrio Omnifit (diámetro 10 mm, longitud 100 mm) se cargó con 250 mg de carbón activado Nuchar HD (MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, EE.UU.) en suspensión en agua para dar un volumen de columna rellena de 1 mL. La columna se equilibró con tampón Tris 25 mM a pH 7. Después se hicieron pasar 29 mL de la elución de cromatografía de Proteína A mAb a través del carbón activado a 0,2 mL/min proporcionando un tiempo de residencia de 4 min. 1 mL de la elución tratada con carbón activado se dejó a un lado para análisis.

35 Después se humidificó con agua un dispositivo de 0,08 mL ChromaSorb™ (EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.) según las instrucciones y después se sobrealimentó con Tris pH 7 25 mM. Después se hicieron pasar 27 mL de la elución tratada de carbón activado a través del dispositivo ChromaSorb a un caudal de 0,5 mL/min dando un tiempo de residencia de 0,16 minutos. 1 mL de la elución tratada con carbón activado y ChromaSorb se dejó a un lado para análisis.

40 Cada muestra se analizó de concentración de proteína de la célula huésped (HCP) e IgG. El análisis HCP se realizó usando un kit *E. Coli* HCP ELISA comercialmente disponible de Cygnus Technologies, Southport, NC, EE.UU., (número de catálogo F410), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. La concentración IgG se midió usando un sistema Agilent HPLC equipado con una columna analítica de Proteína A Poros® A.

45 Los resultados muestran que el carbón activado solo y en combinación con una membrana AEX era inesperadamente eficaz para la eliminación selectiva de HCP de la elución capturada de una alimentación microbiana. La concentración de HCP en la elución se redujo por el carbón activado de 86 ng/mL (7 ppm) a 8 ng/mL (0,7 ppm) mientras que la recuperación del mAb era 97% comenzando a una concentración de 11,5 g/L y recuperado a 11,2 g/L. La concentración de HCP en la elución tratada con carbón activado fue adicionalmente reducida por la membrana ChromaSorb AEX a 3 ng/mL (0,3 ppm) con una recuperación global de 96% del mAb para dar una concentración final de 11,1 g/L. Este ejemplo demuestra que el carbón activado solo y en combinación con un medio AEX se puede usar para eliminar HCP derivado de células no mamíferas después de una etapa de captura.

55 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc., usadas en la memoria descriptiva, incluyendo reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de purificación que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar un fluido de cultivo celular clarificado a un medio de afinidad de elución y unión;
 - b) hacer salir el flujo de la etapa a) a través de carbón activado;
 - 5 c) hacer salir el flujo de la etapa b) a través de un medio de intercambio aniónico; y
 - d) hacer salir el flujo de la etapa c) a través de un medio de intercambio catiónico,en donde se reduce el nivel de una o más impurezas.
2. El proceso de purificación de proteínas según la reivindicación 1, en donde la etapa de unir y eluir con un medio de afinidad se opera en:
 - 10 i) modo discontinuo donde el medio de afinidad se carga con proteína diana, se detiene la carga, el medio se lava y se eluye, y se recoge el conjunto de fracciones de elución;
 - ii) modo semi-continuo, donde la carga se realiza de forma continua, mientras que la elución es intermitente; o
 - iii) modo completamente continuo, donde tanto la carga como la elución se realizan de forma continua.
3. El proceso de purificación de proteínas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se realiza una etapa de inactivación después de la etapa a).
15
4. El proceso de purificación de proteínas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye además etapas para cambiar las condiciones de disolución en línea o mediante tanque de compensación.
5. El proceso de purificación de proteínas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa a) comprende unir y eluir con un medio de afinidad de proteína A.
- 20 6. El proceso de purificación de proteínas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye además inactivación en línea del virus.
7. El proceso de purificación de proteínas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la purificación de flujo pasante comprende: carbón activado seguido de medio de intercambio aniónico de flujo pasante seguido de cambio de disolución usando un mezclador estático y/o tanque de compensación en línea, seguido de
25 medio de intercambio catiónico de flujo pasante, seguido de filtración de virus y formulación.
8. Un proceso de purificación de flujo pasante que comprende: proporcionar un eluyente de proteína A que se ha sometido a una inactivación de virus a, en orden, un dispositivo de carbón activado, un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico, un dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y una filtración de virus que están conectadas juntas en un modo de flujo pasante; en donde un mezclador estático en línea y/o tanque de
30 compensación está entre los dispositivos de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico para conseguir un cambio de pH.
9. El proceso de purificación de flujo pasante según la reivindicación 8, en donde se proporciona un filtro profundo corriente arriba del dispositivo de carbón activado en caso de que la muestra que se va a purificar esté turbia.

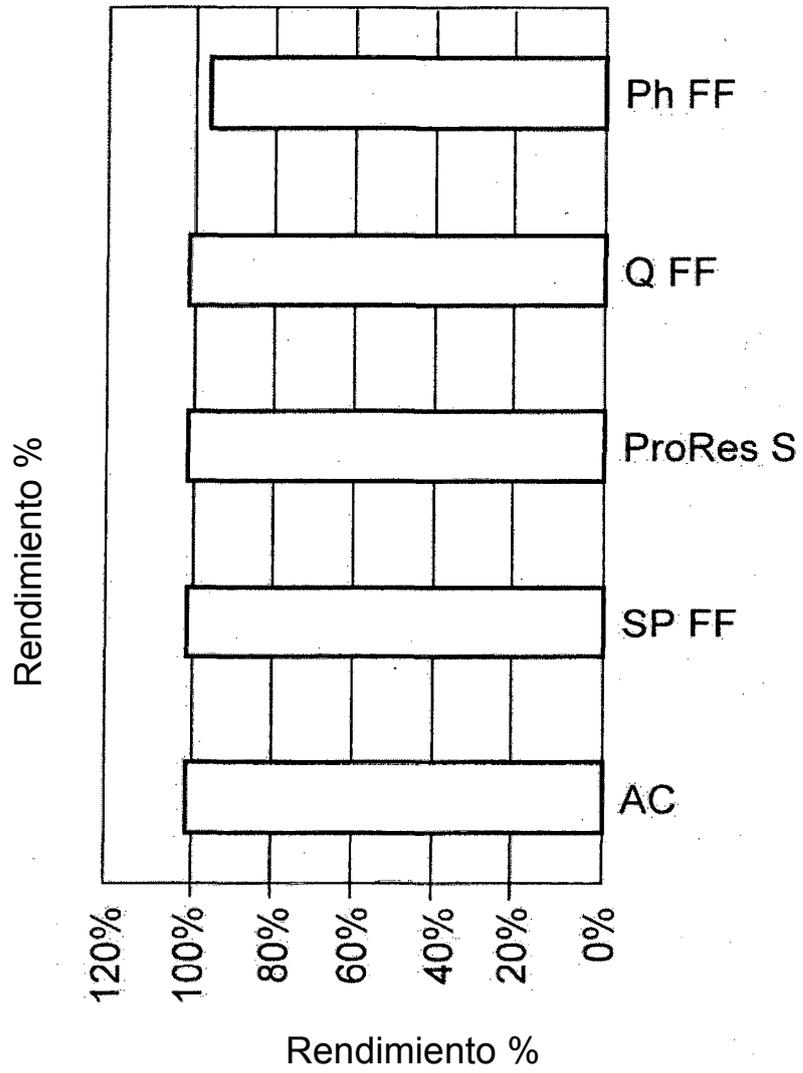


Figura 1

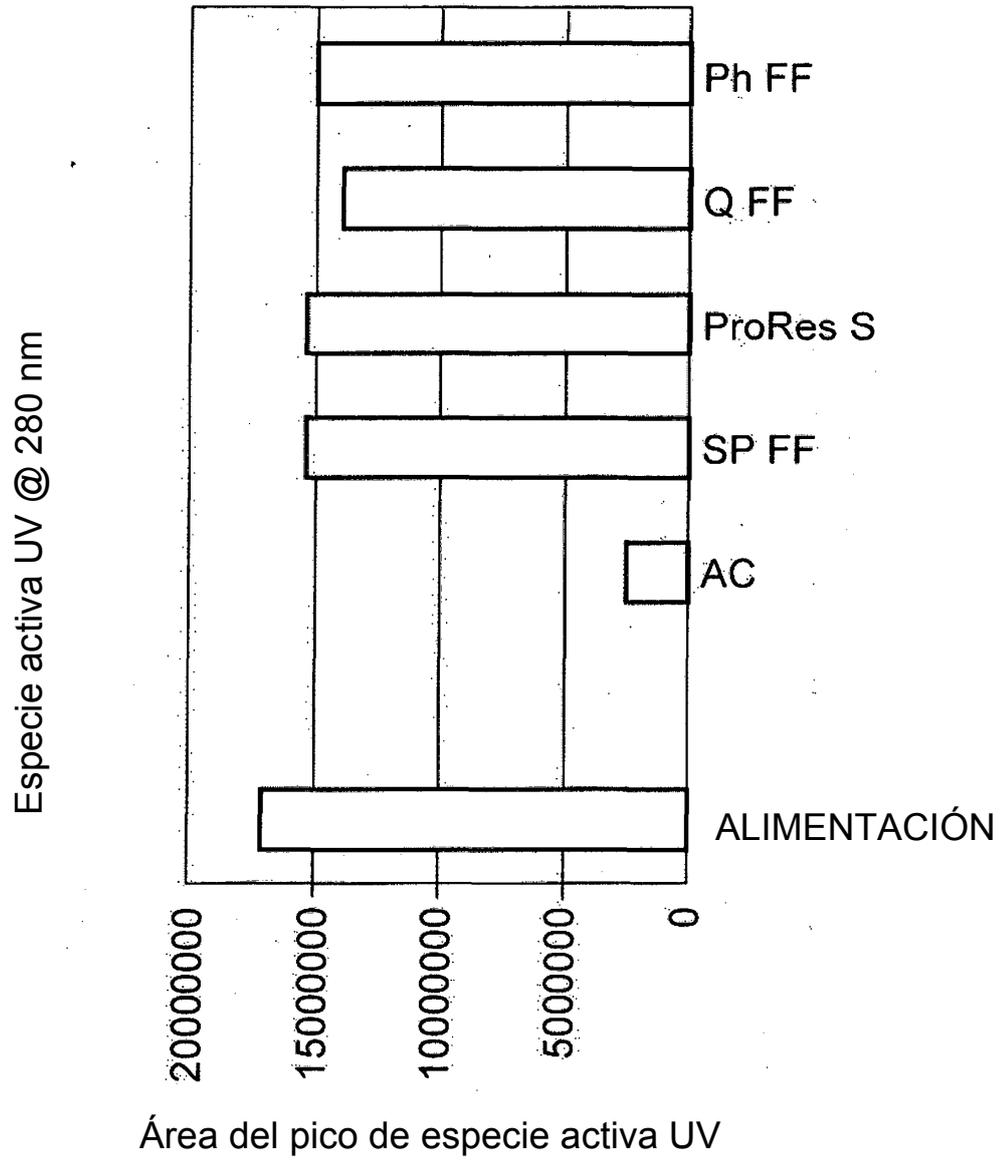


Figura 2

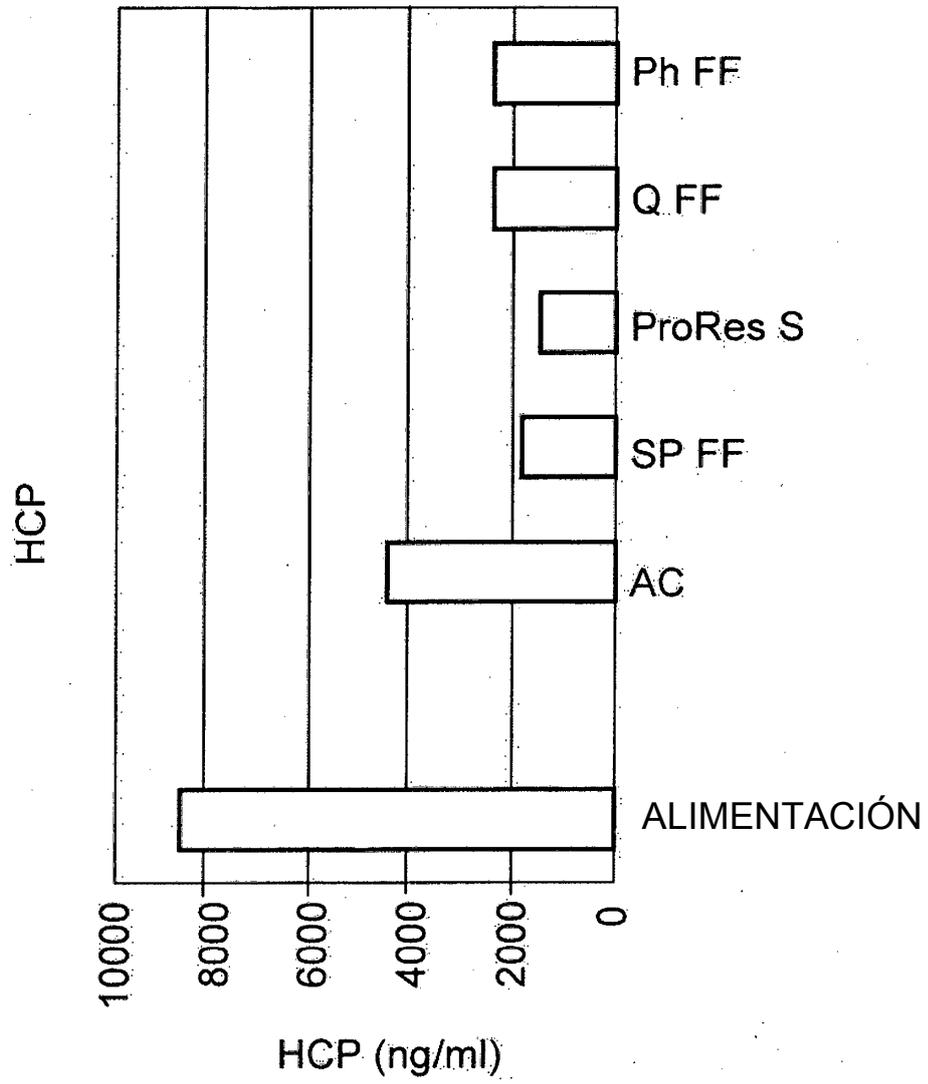


Figura 3

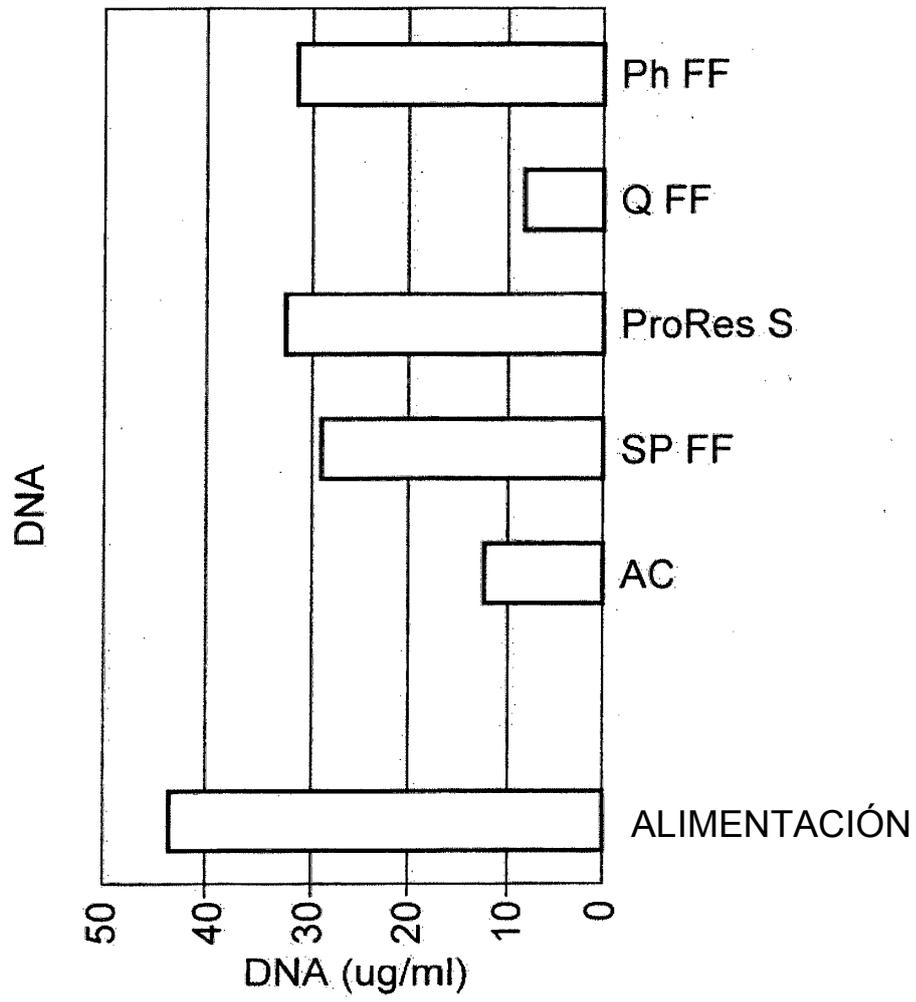


Figura 4

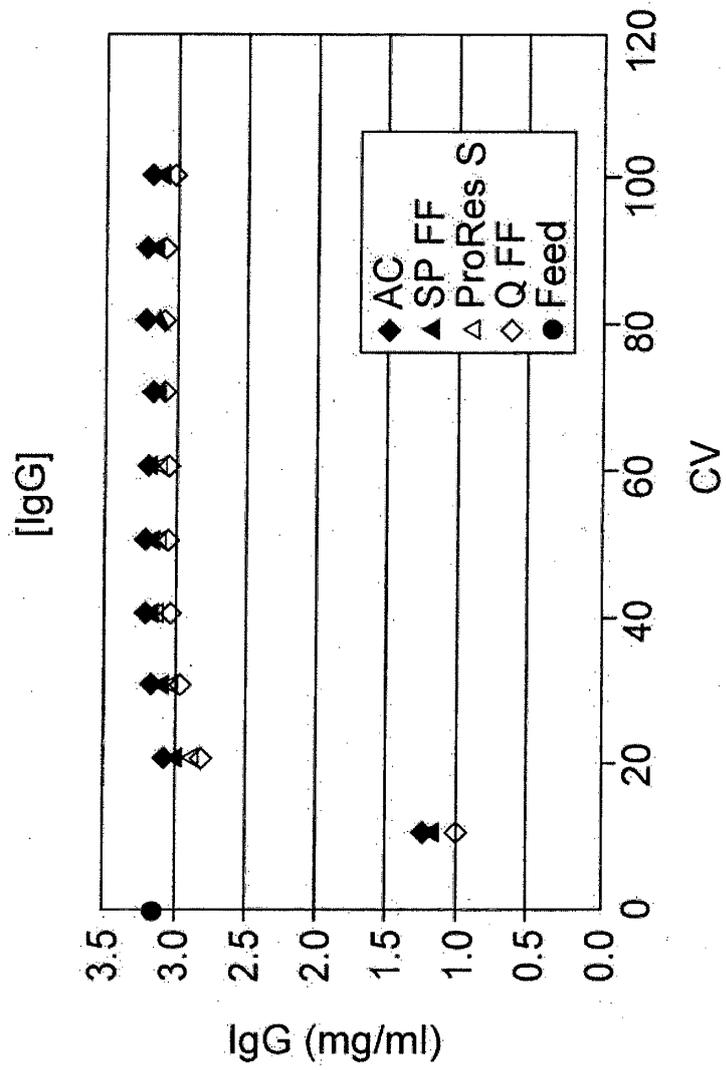


Figura 5

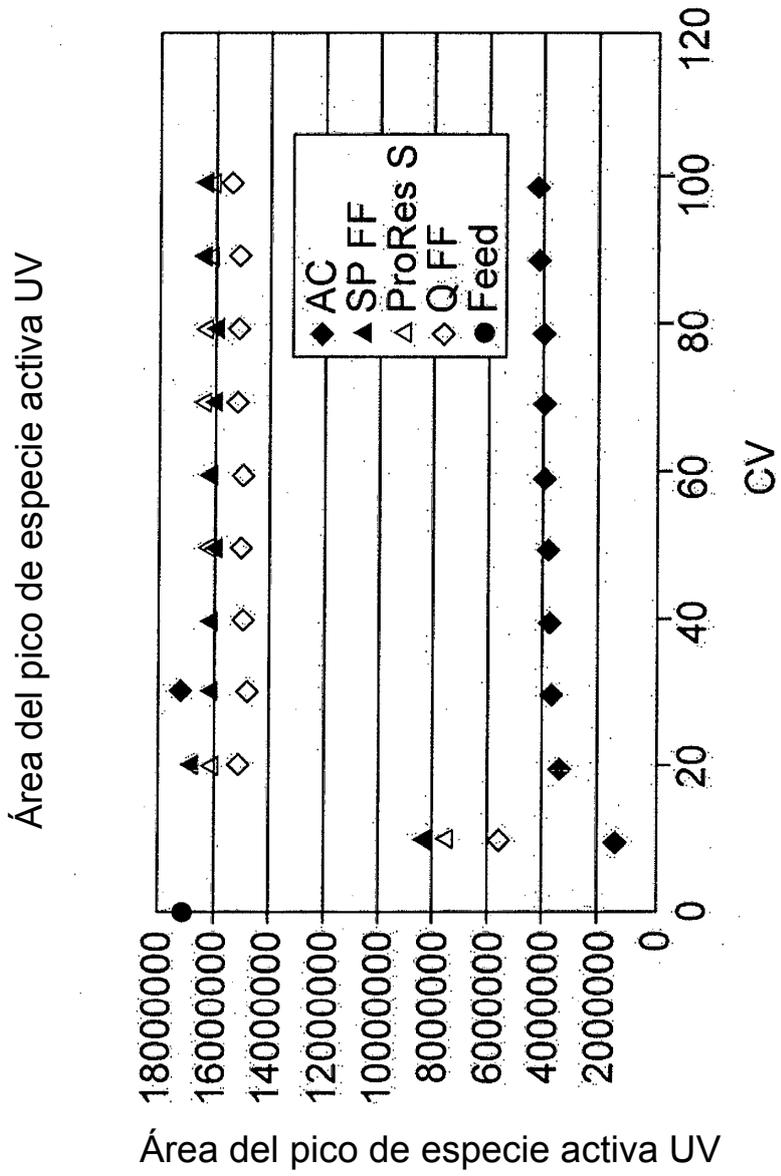


Figura 6

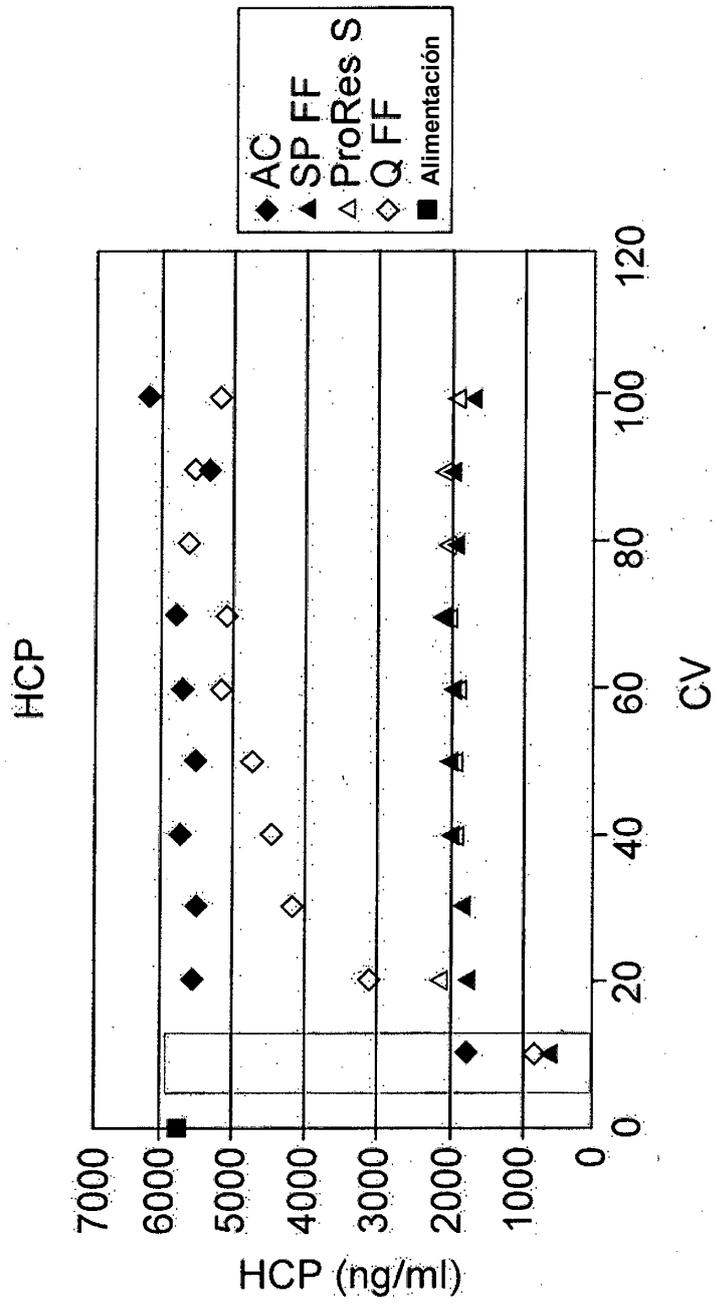


Figura 7

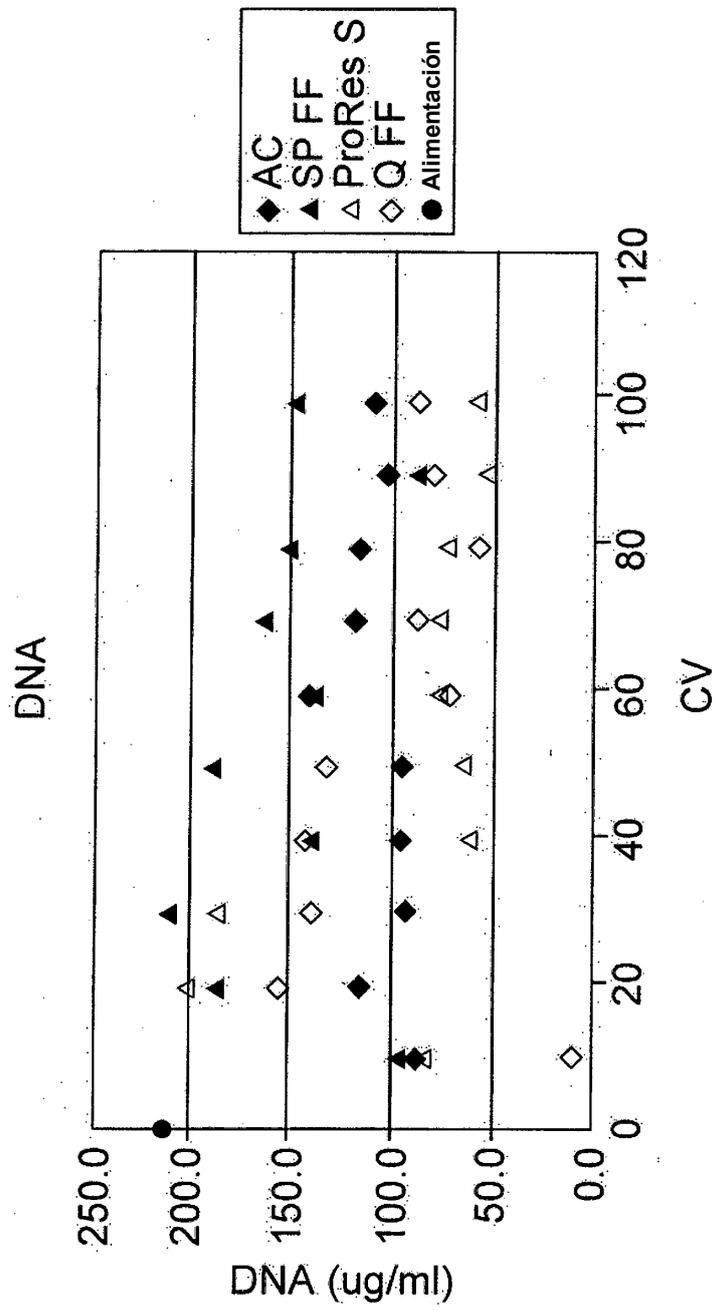


Figura 8

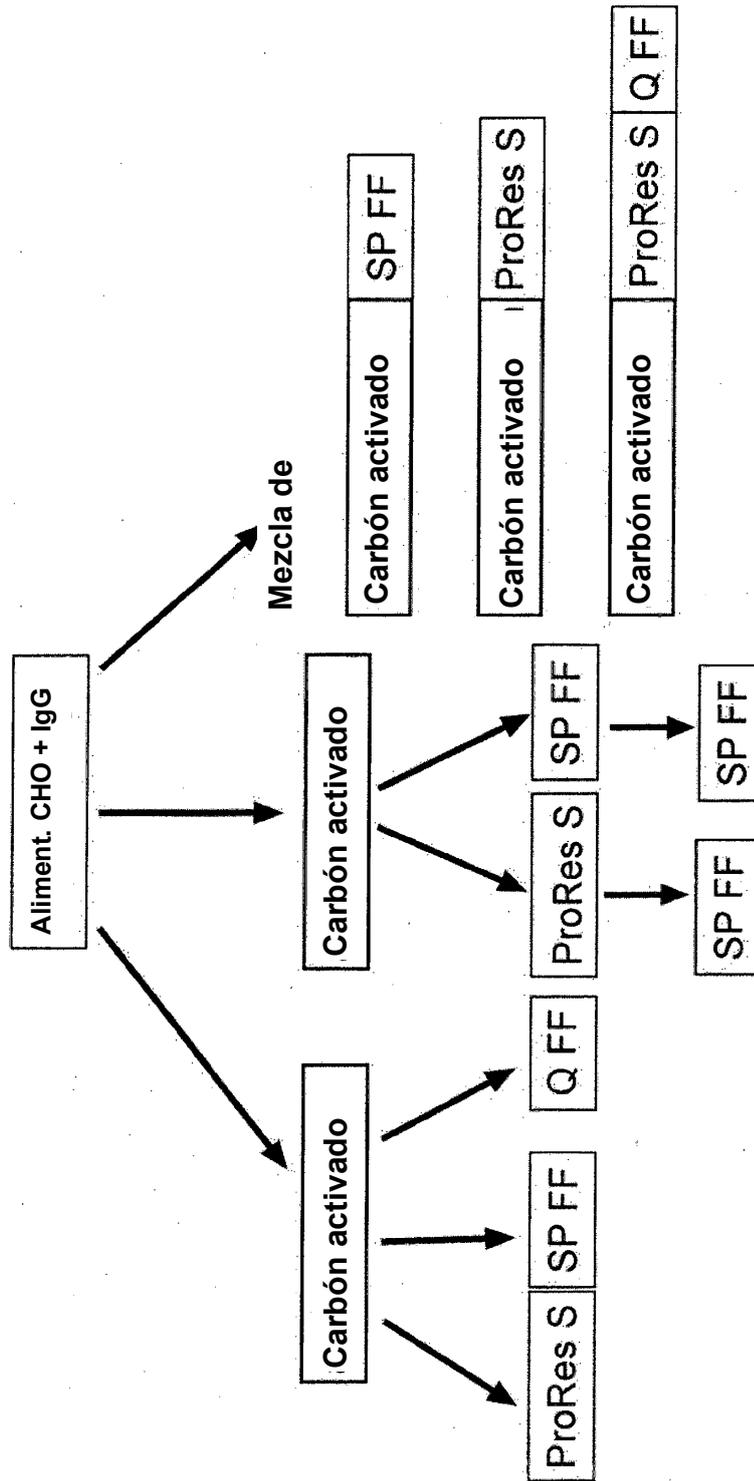


Figura 9

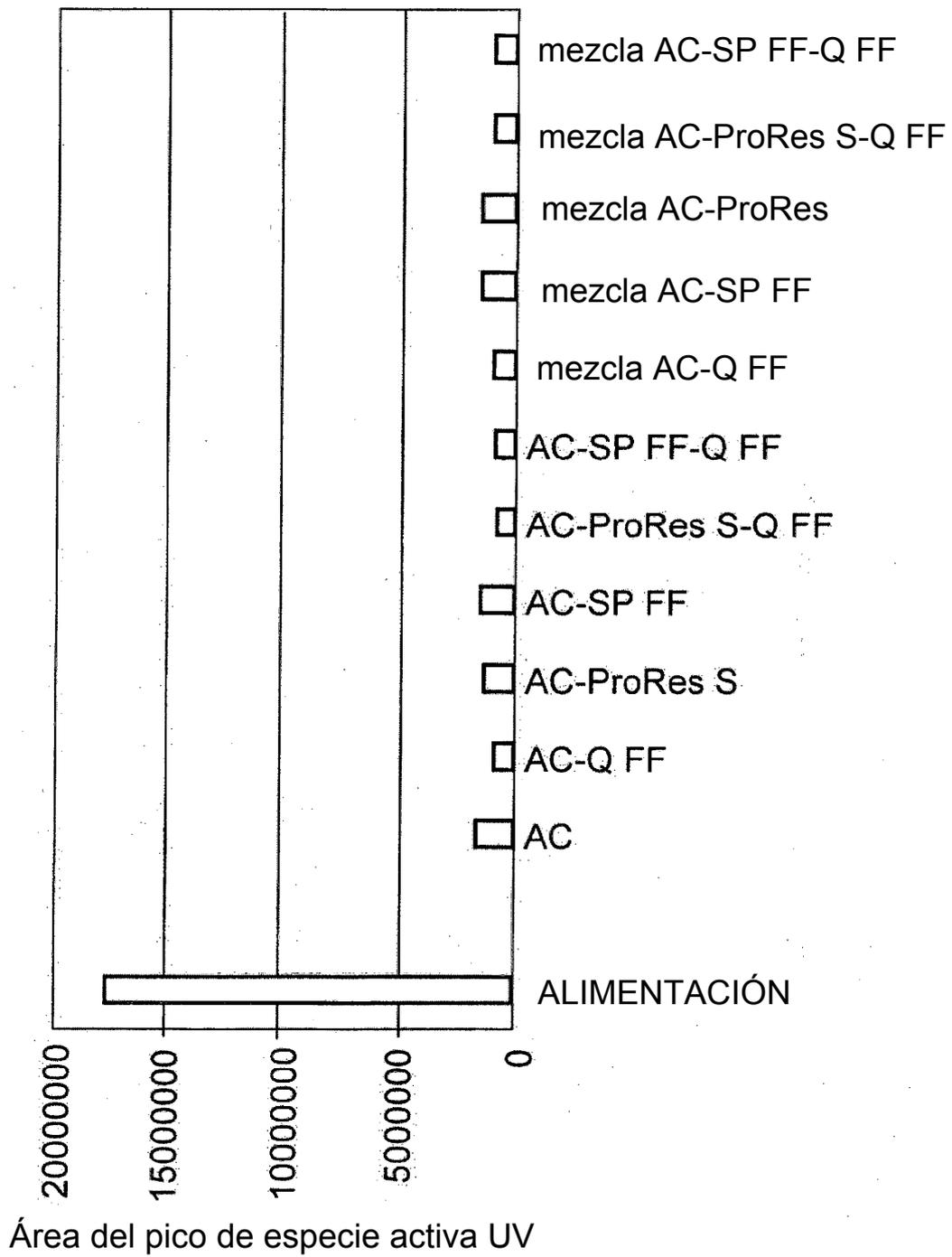


Figura 10

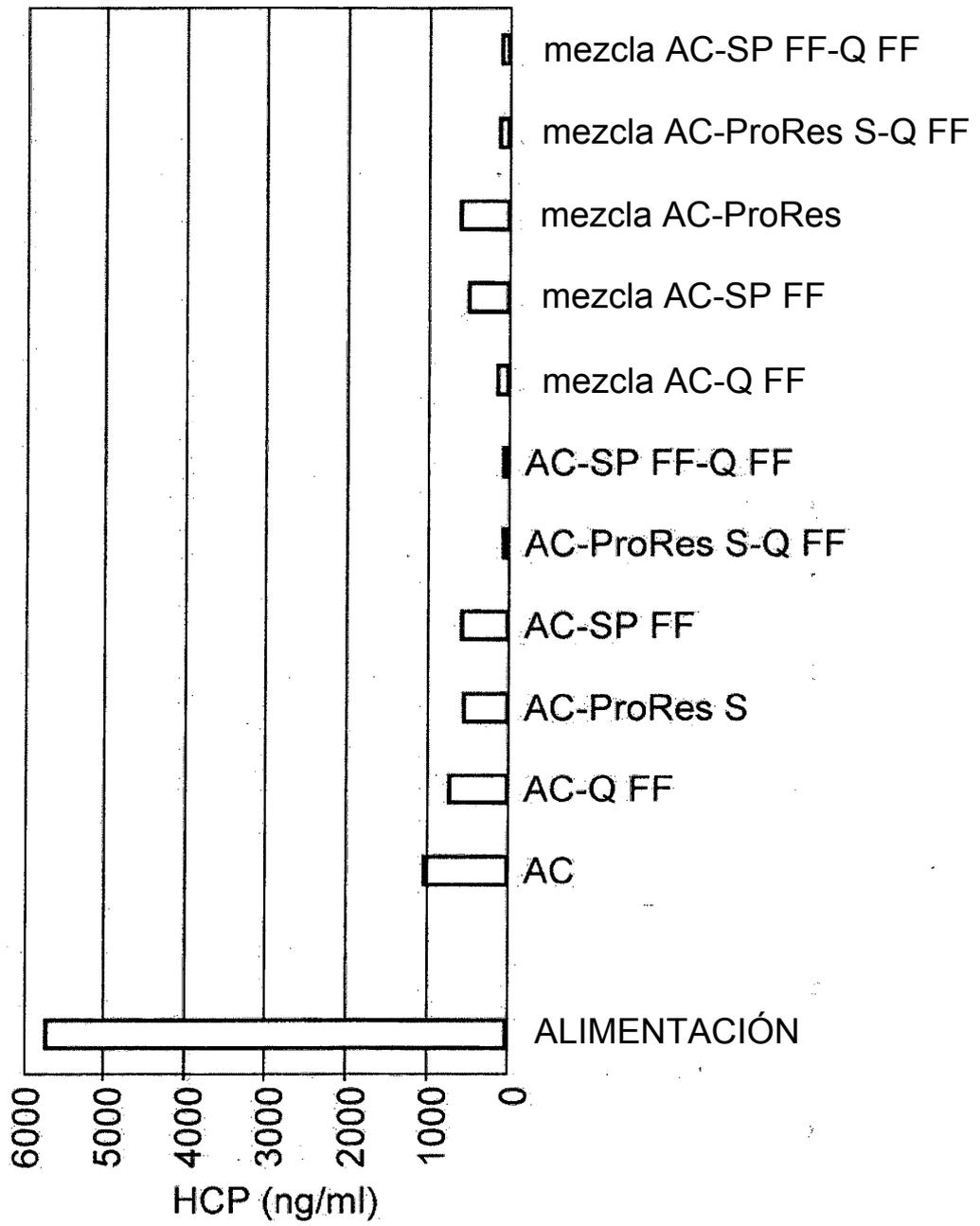


Figura 11

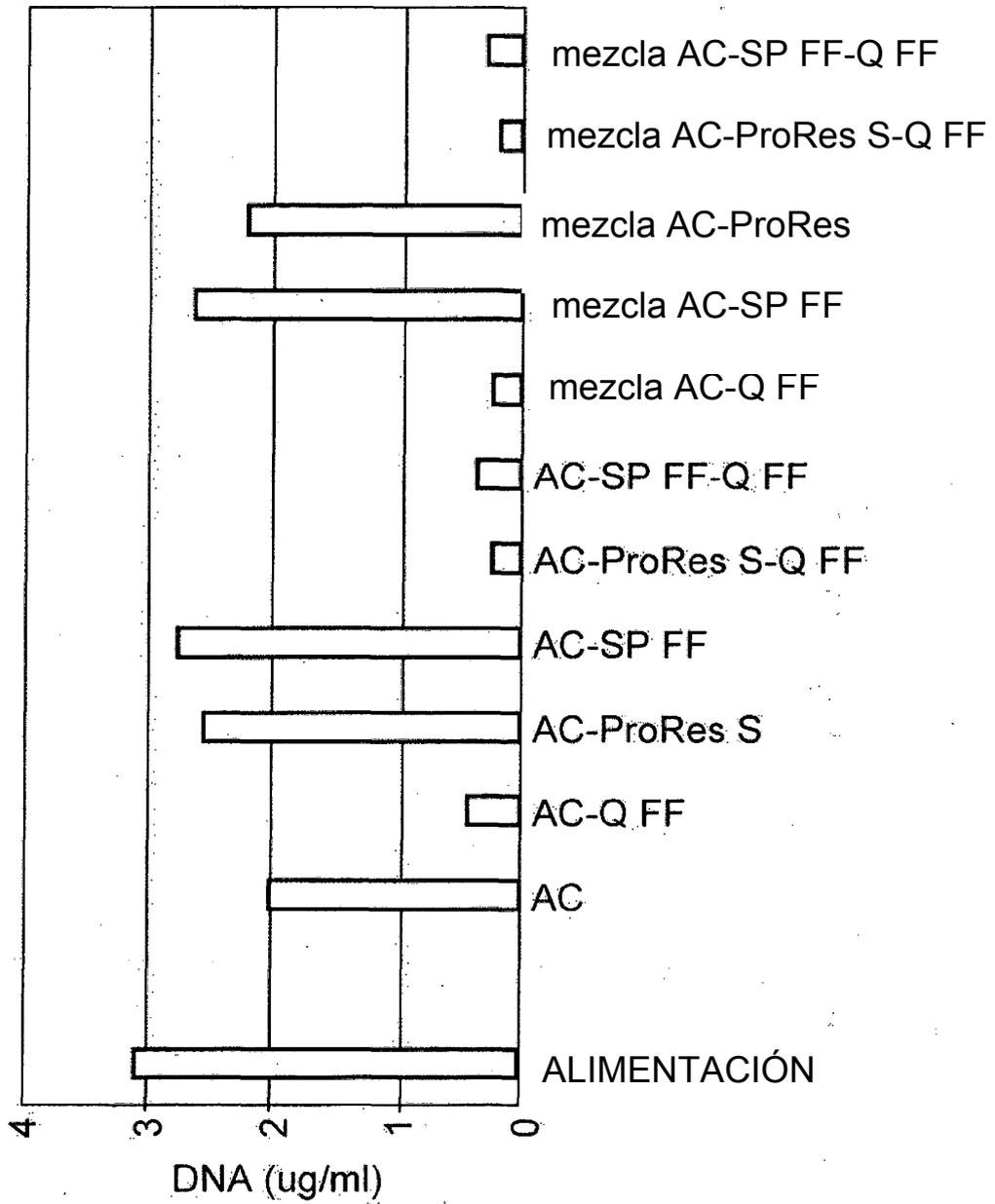


Figura 12

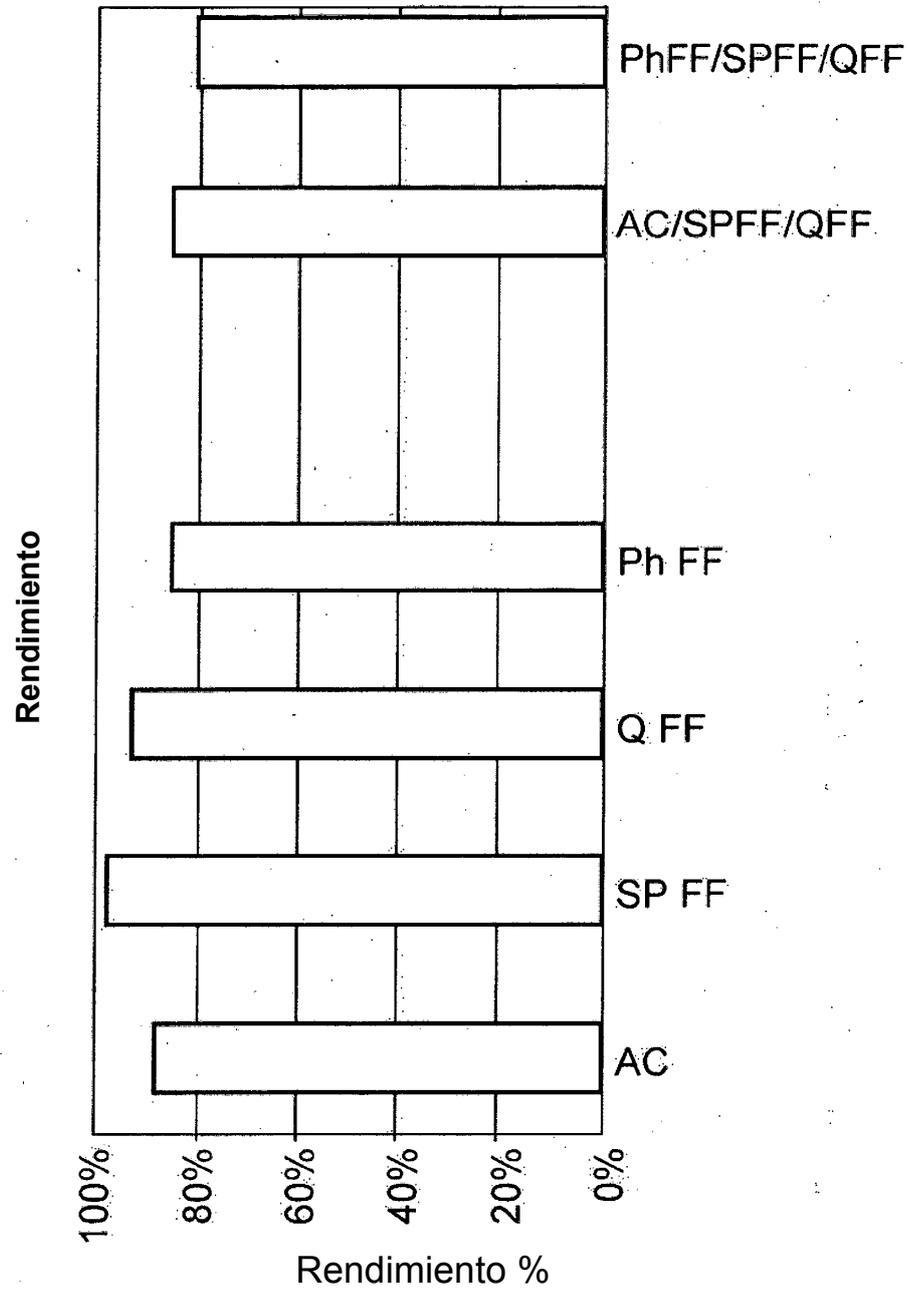


Figura 13

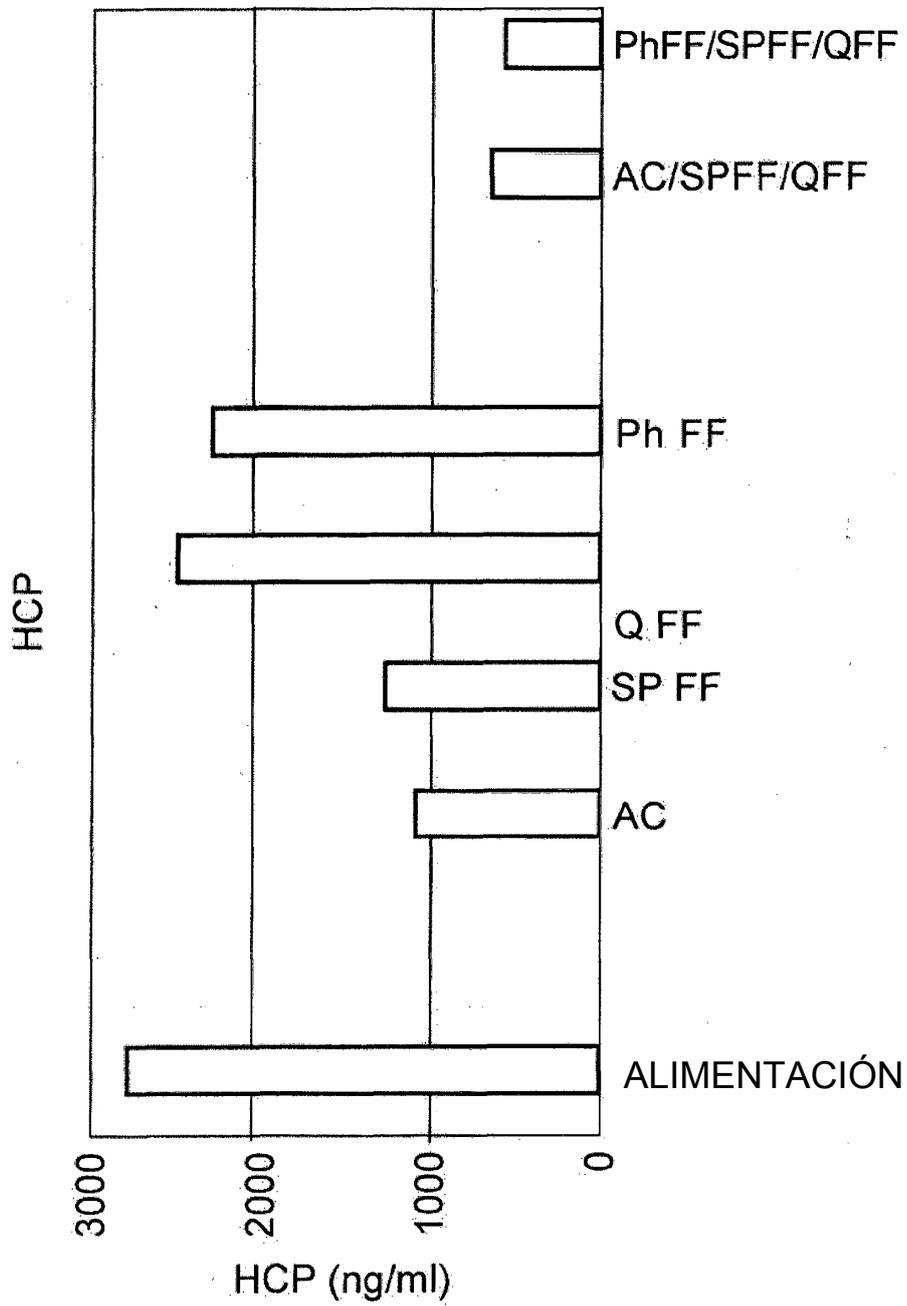


Figura 14

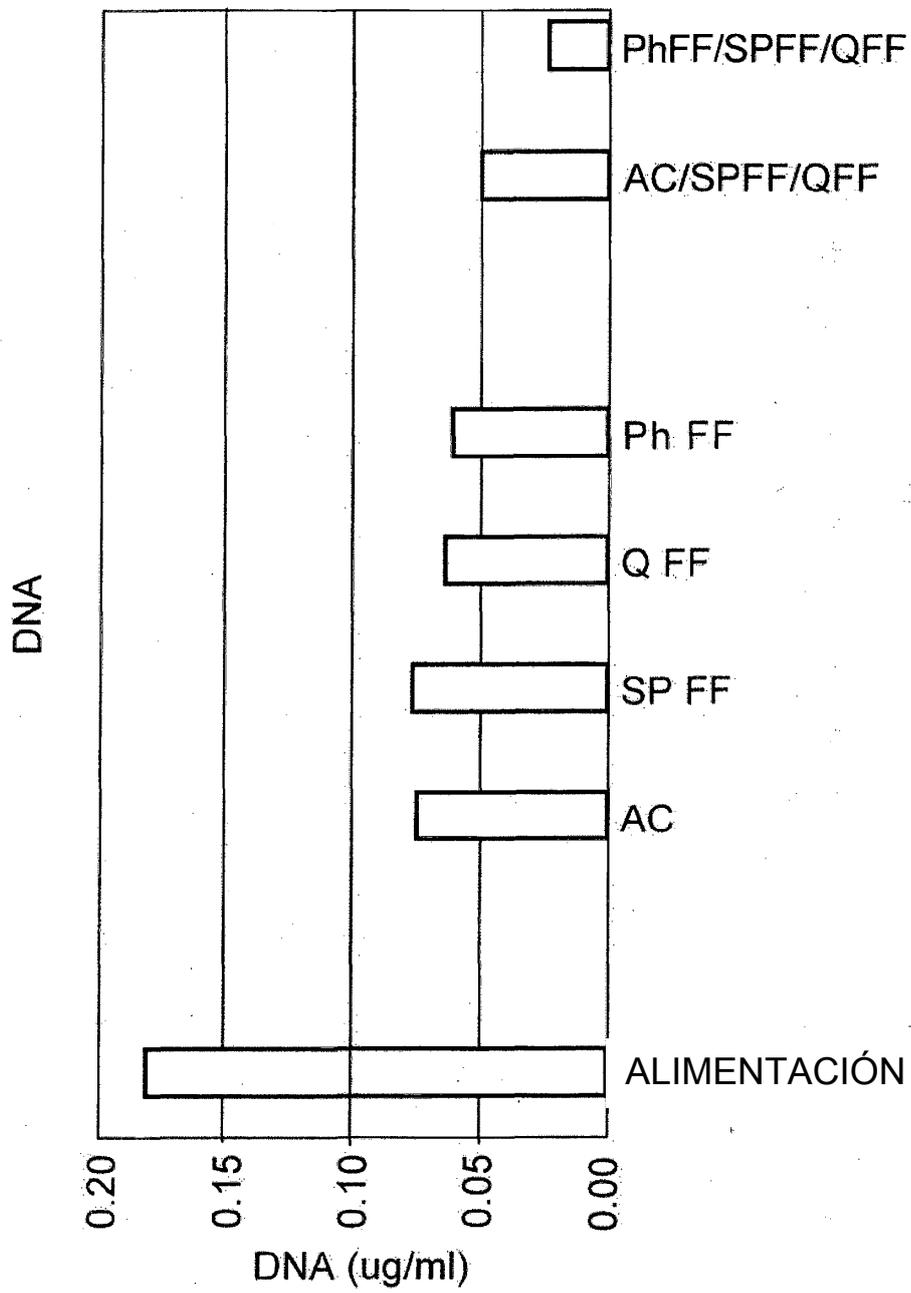


Figura 15

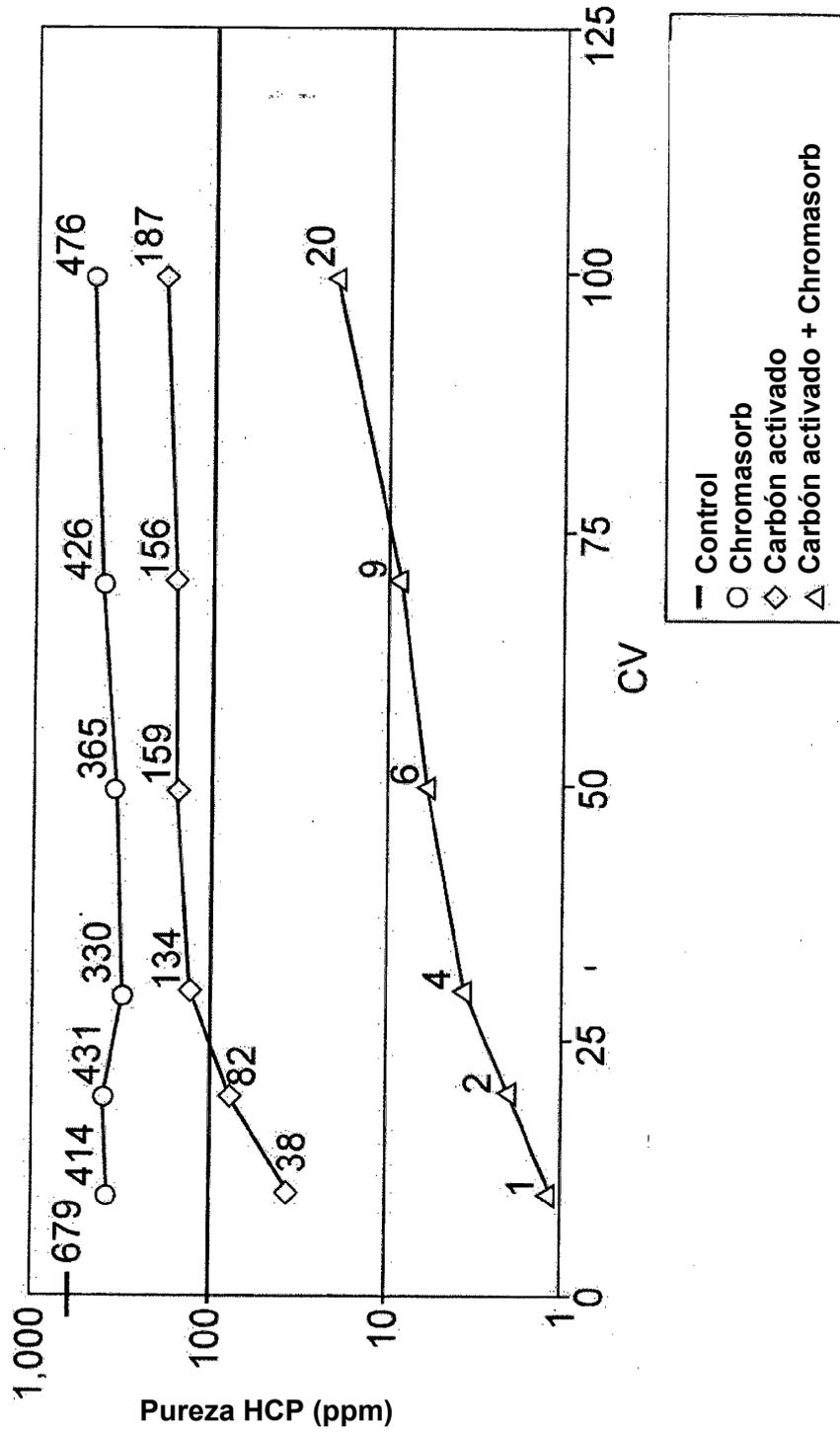


Figura 16

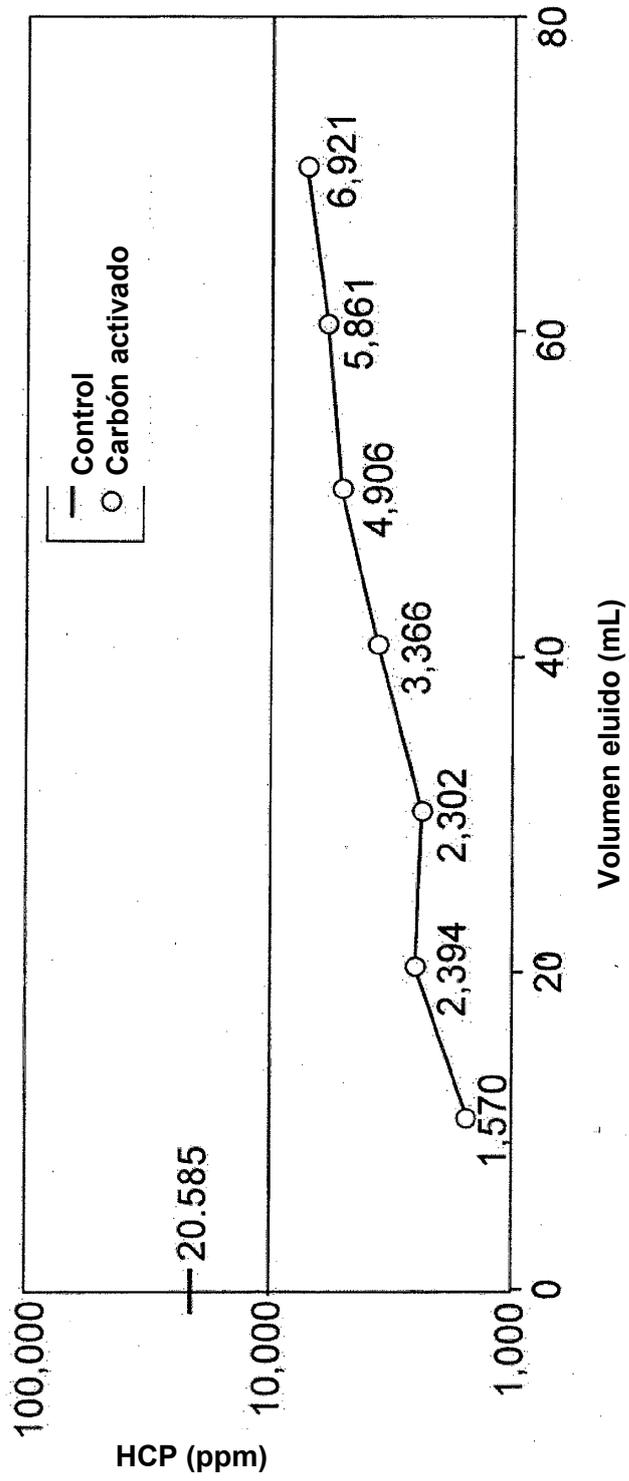


Figura 17

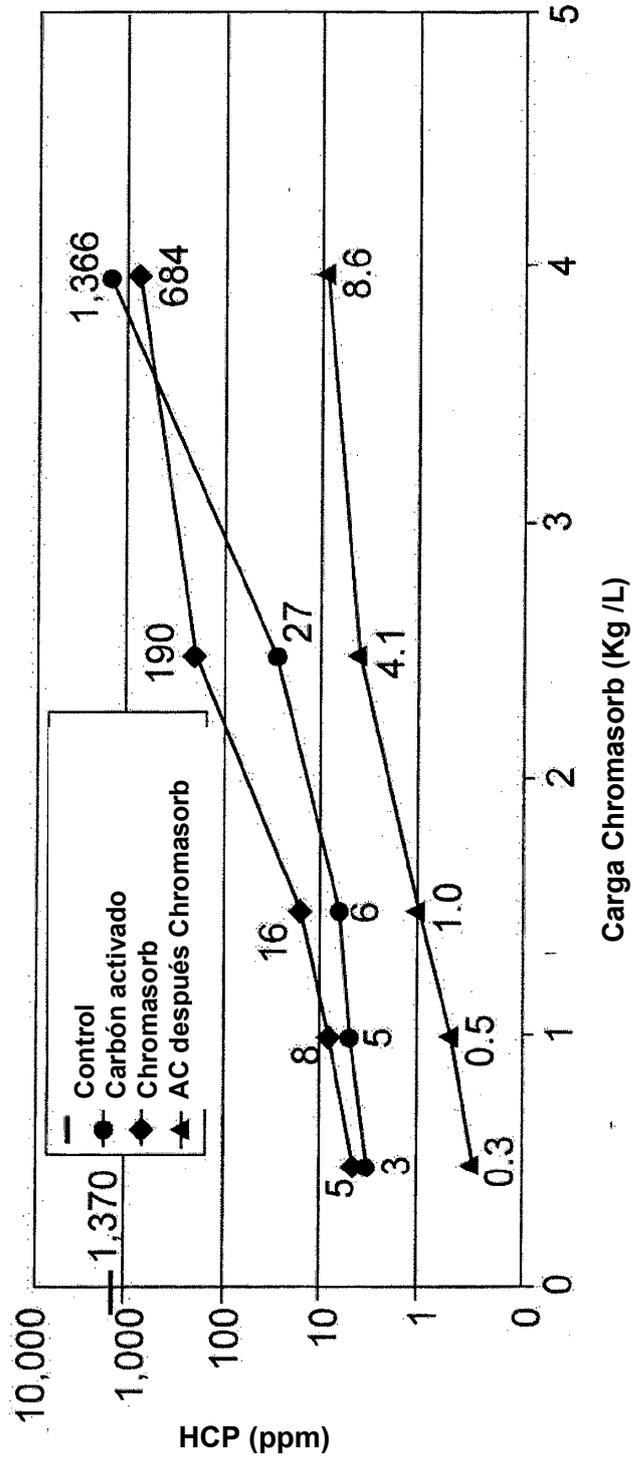


Figura 18

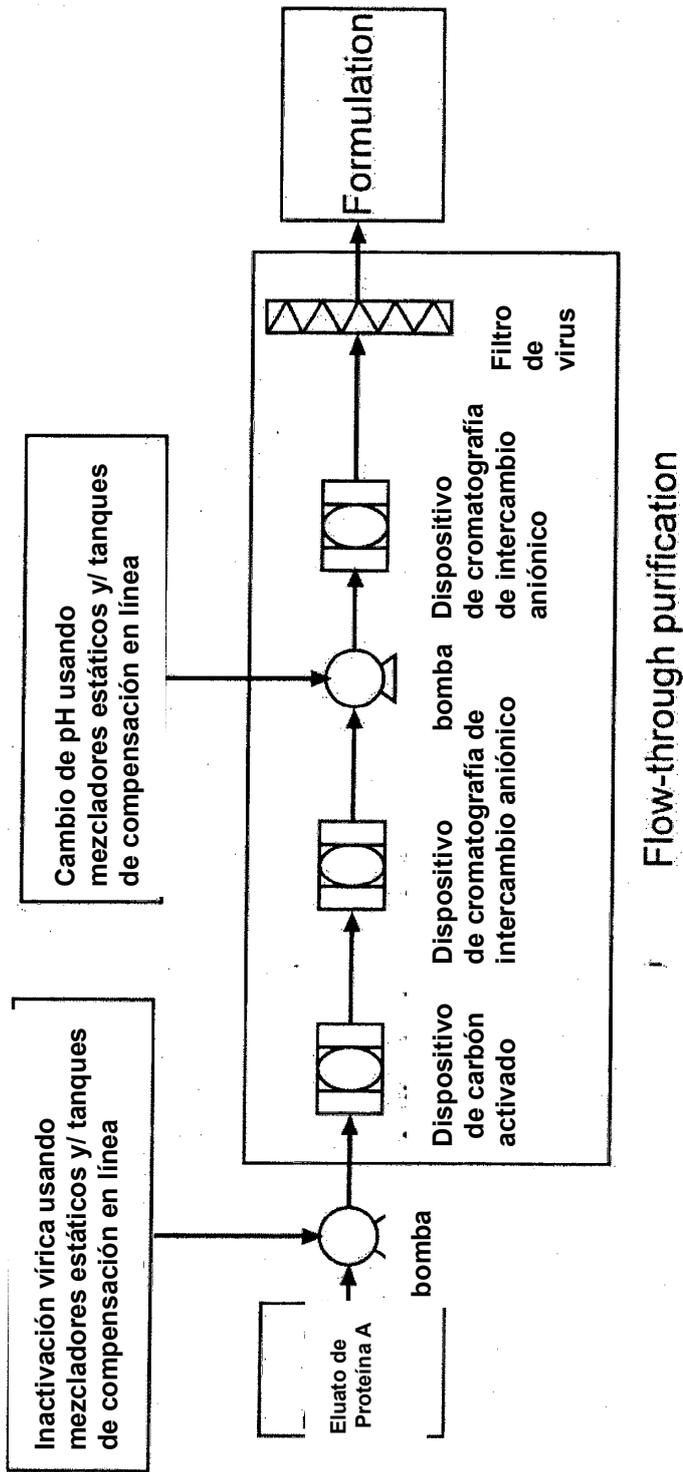


Figura 19

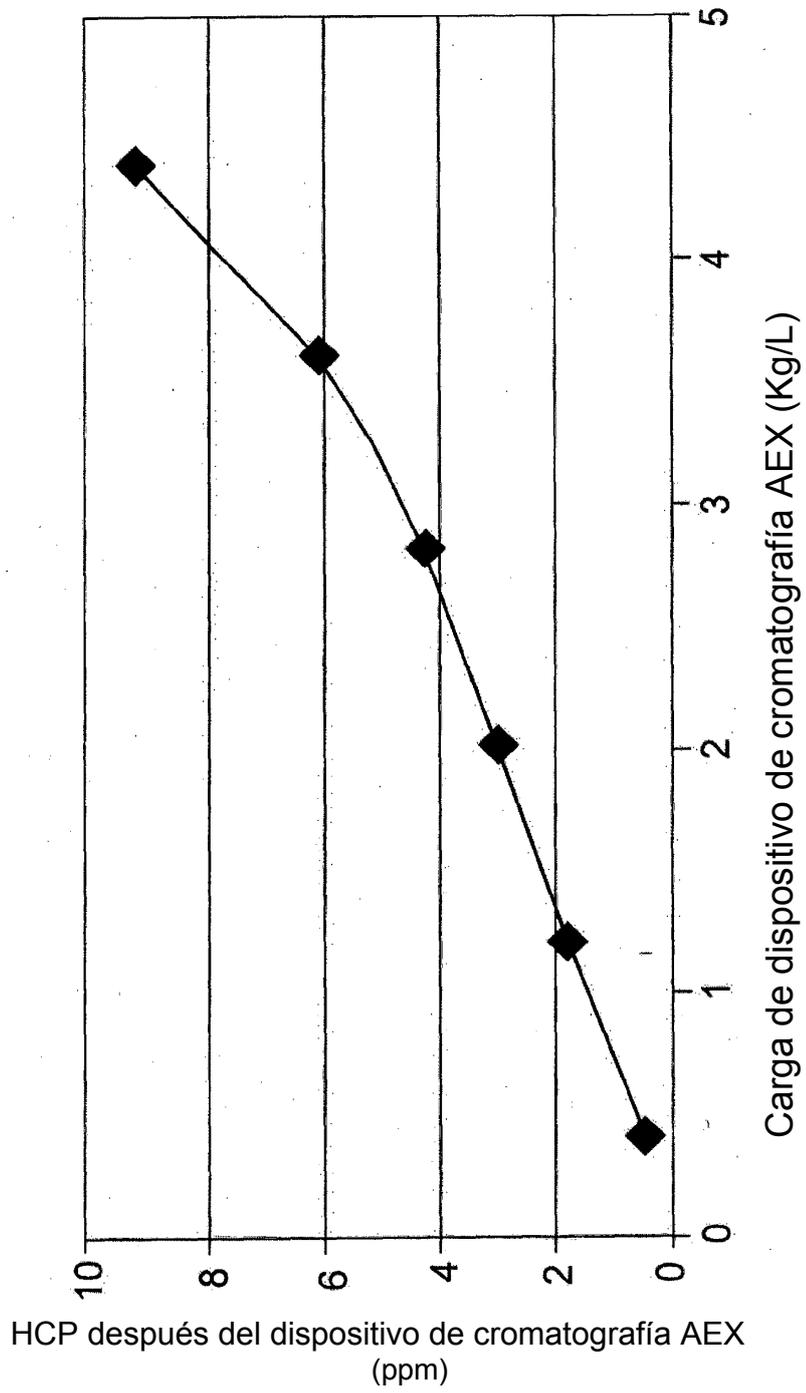


Figura 20

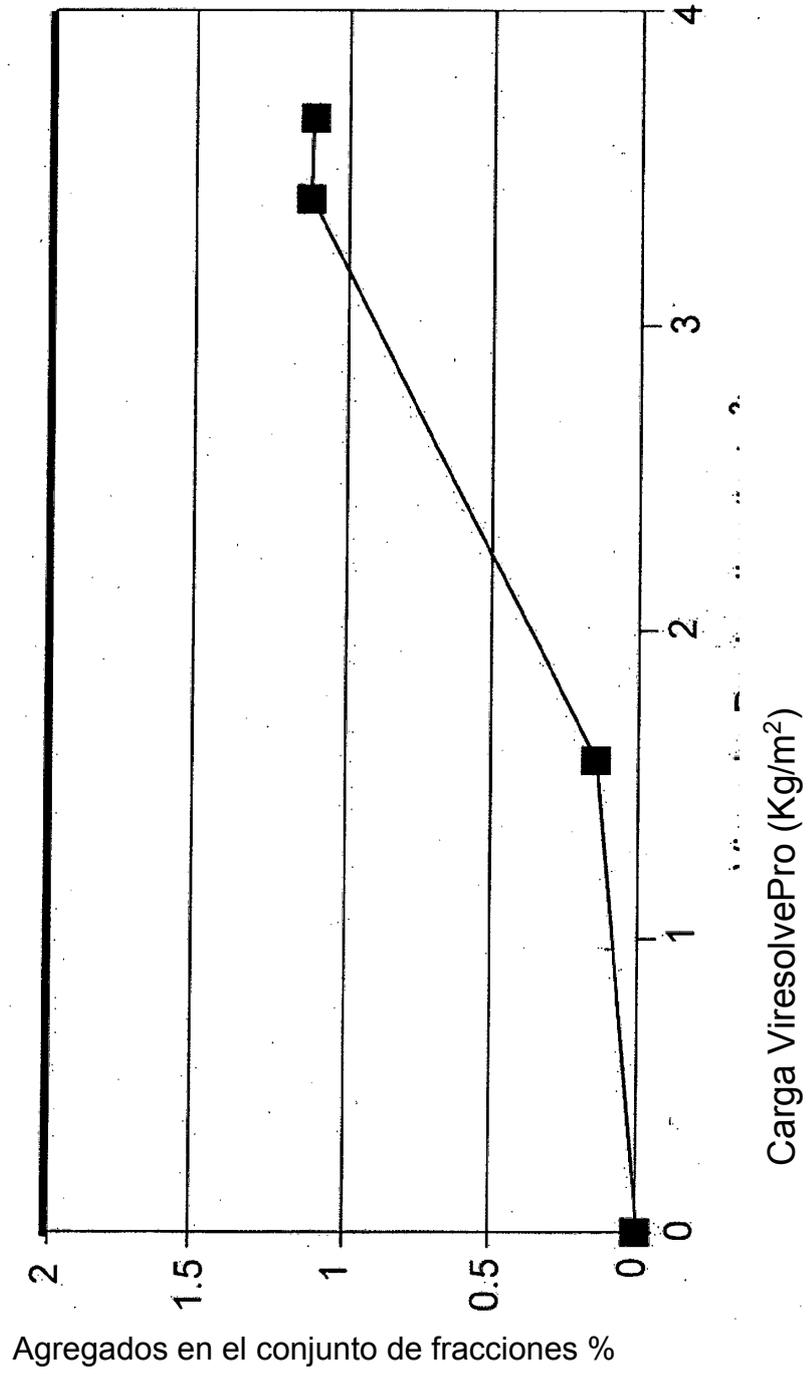


Figura 21

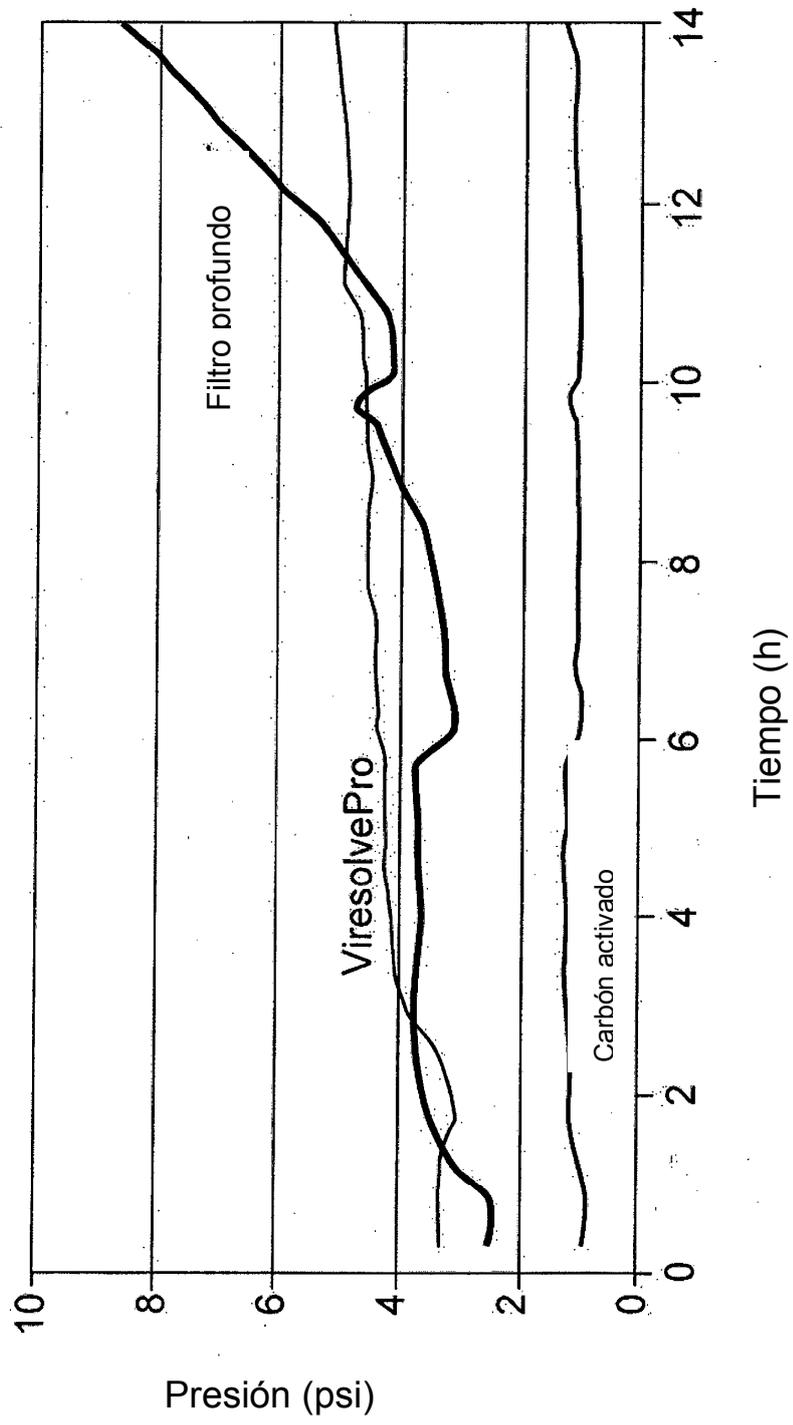


Figura 22