

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 066**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2015 PCT/NL2015/050046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112015**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2015 E 15703640 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3097188**

54 Título: **Procesamiento para recuperación y purificación de una fosfatasa alcalina**

30 Prioridad:

24.01.2014 EP 14152542

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

30.10.2018

73 Titular/es:

**AM-PHARMA B.V. (100.0%)
Rumpsterweg 6
3981 AK Bunnik, NL**

72 Inventor/es:

**JONK, LUIGI JOHANNES CORNELIUS;
CONNOR, STEPHEN EDWARD;
VAN DEN BERG, ERIK JAN;
VAN ELSAS, ANDREA;
SHUKLA, ABHINAV ALOK;
HORNE, HEATHER BETHEA;
COOK, SUSAN;
KELLY, TIMOTHY MARTIN;
DOWLING, VICTORIA ANNE y
RAMAROSON, MIALY FANJAMALALA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 688 066 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

Procesamiento para recuperación y purificación de una fosfatasa alcalina

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo del procesamiento para recuperación y purificación (DSP) de una fosfatasa alcalina (AP). Más específicamente, se refiere a un método para reducir el contenido de proteína de la célula huésped en una composición que comprende AP. La invención se refiere además a una composición que comprende una AP y un contenido reducido de una proteína de la célula huésped.

Introducción

15 Fosfatasa alcalina (AP)

AP; EC 3.1.3.1 de acuerdo con la nomenclatura de enzimas de la IUBMB, el nombre común es fosfatasa alcalina (AP), es una enzima que cataliza la reacción de un monoéster de fosfatasa y H₂O hasta un alcohol y fosfato. Otro nombre o nombres para la AP son fosfomonoesterasa alcalina; fosfomonoesterasa; glicerofosfatasa; fosfohidrolasa alcalina; fenil fosfatasa alcalina; monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa (alcalino óptimo). El nombre sistémico de AP es monoéster fosfato fosfohidrolasa (alcalino óptimo).

AP es una enzima de amplia especificidad, también cataliza transfosforilaciones. En humanos y otros mamíferos, se conocen al menos cuatro fosfatasas alcalinas distintas, pero relacionadas. Estas son intestinal (ALPI), placentaria (ALPP, solo en humanos y primates), tipo placentario (GCAP) y fosfatasa alcalina de hígado/hueso/riñón (o no específica de un tejido) (TNAP). Las tres primeras se encuentran juntas en el cromosoma 2, mientras que la forma no específica de un tejido se encuentra en el cromosoma 1.

La persona experta conoce la secuencia de aminoácidos de las fosfatasas alcalinas y las posiciones relativas de los dominios catalíticos y corona. Como ejemplo, se hace referencia al libro de texto sobre fosfatasas alcalinas de mamíferos por Millán (Mammalian Alkaline Phosphatases, Wiley-VCH (2006), ISBN-13: 978-3-527-31079-1) que muestra, entre otros, la secuencia de aminoácidos de las cuatro fosfatasas alcalinas humanas.

AP para uso farmacéutico

35 Anteriormente se ha demostrado que la AP es beneficiosa como medicamento en una amplia gama de enfermedades (lesión renal aguda (AKI), sepsis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), etc.). Estos estudios han utilizado AP de origen natural, tal como AP aislada de bovino así como humana aislada y recombinante. En algunos modelos animales, se ha usado una fosfatasa alcalina quimérica recombinante que comprende el dominio catalítico de una AP intestinal humana y un dominio corona de una AP placentaria humana (descrita en el documento WO2008133511). En la actualidad, se está desarrollando una composición farmacéutica que comprende una fosfatasa alcalina quimérica recombinante nueva y mejorada que tiene una secuencia como se representa en la Figura 18 (SEQ ID NO: 1) para uso como medicamento.

45 Durante el desarrollo de la composición farmacéutica, se hizo uso de procesos estándar (DSP) para proteínas, y en particular AP, tales como cromatografía de afinidad (Mimetic Blue AP®), de intercambio aniónico (Poros 50 HQ®) y modo mixto (Cromatografía Capto-Adhere®). Una vez optimizadas las etapas de DSP y la composición farmacéutica cumplió con las especificaciones establecidas y requeridas previamente por las autoridades reguladoras, se realizaron preparativos para la producción de lotes clínicos. Sin embargo, durante la prueba de estabilidad de la etapa final, se observó la formación de partículas.

50 Este fue un problema imprevisto y debido a que la formación de partículas es un aspecto no deseado en las composiciones farmacéuticas, se tenía que encontrar una solución.

55 No estaba claro cuál era la identidad de las partículas y tras la recogida de las partículas mediante centrifugación y análisis, se enriqueció una banda no de AP en geles SDS-PAGE no reductores teñidos con plata. El análisis de espectrometría de masas de las digestiones enzimáticas de esta banda reveló la presencia de proteína de la célula huésped (HCP) pero no de AP. Esto no fue previsto en particular porque, de acuerdo con las pruebas previas para la proteína de la célula huésped, había muy poca cantidad de HCP (<100 ppm) en la composición para explicar la cantidad relativamente grande de partículas.

60 Proteínas de células huésped (HCP)

65 Las HCP son proteínas que se producen o codifican por células u organismos que se usan en el proceso de producción y no están relacionadas con el producto deseado. Algunas son necesarias para el crecimiento, la supervivencia y el procesamiento celular normal, mientras que otras pueden no ser esenciales. Al igual que el producto deseado, las HCP también pueden ser modificadas por el huésped con una serie de modificaciones postraduccionales.

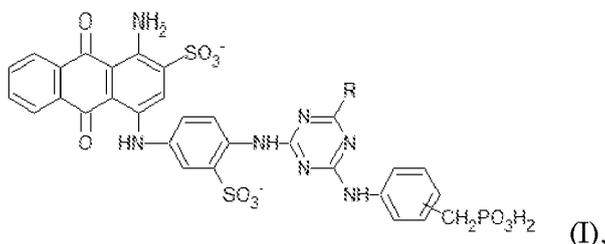
Independientemente de la utilidad, o la falta de la misma, las HCP son generalmente indeseables en una sustancia farmacológica final. Aunque comúnmente están presente en pequeñas cantidades (partes por millón expresadas en nanogramos por miligramos de la proteína deseada), la industria se esfuerza y gasta mucho para eliminarlas. (Wang y col., *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, No. 3, 15 de junio de 2009).

Antes de la aprobación de un producto biológico para uso terapéutico, el nivel de HCP residual en el producto debe medirse cuantitativamente, de acuerdo con los documentos "Puntos a Considerar" emitidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, o las "Notas para Orientación". Por lo tanto, la HCP debe ser típicamente eliminado y la eliminación debe demostrarse durante el DSP. Los métodos analíticos actuales para analizar la presencia de HCP contaminantes en productos biológicos recombinantes incluyen SDS-PAGE, técnicas de inmunotransferencia y ELISA. Existen muchas publicaciones sobre la eliminación de la contaminación y eliminación de HCP, por ejemplo, usando, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (Shukla y col., *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 556-564), cromatografía de Proteína A (Shukla y col., *Biotechnol. Prog.* 2008, 24, 11151121), o ligandos de intercambio aniónico tolerantes a la sal (Riordan y col., *Biotechnol. Prog.* 2009, Vol. 25, No. 6).

Por lo tanto, existe la necesidad de un DSP y una formulación optimizados para proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una fosfatasa alcalina con un contenido reducido de HCP y una estabilidad física mejorada.

Los presentes inventores han adaptado tanto el DSP como la formulación final del fármaco para a) reducir el contenido de HCP y b) reducir la formación observada de partículas. El objetivo principal de la adaptación de DSP es la disminución del contenido de HCP, mientras que el objetivo principal de la adaptación de la formulación es disminuir la formación de partículas (visibles), debido a cualquier HCP remanente. Tanto la adaptación de DSP como la adaptación de la formulación, sirven conjuntamente en la disminución de la formación de partículas durante la prueba de estabilidad, mejorando así la estabilidad física de la composición farmacéutica. Al menos cuando se combinan, el DSP mejorado y la nueva formulación dan como resultado una composición farmacéutica, en la que la composición reduce su contenido de HCP y en la que no se produce formación visible de partículas durante la prueba de estabilidad. En este documento se divulga un método para producir una composición que comprende una fosfatasa alcalina aislada y que comprende un contenido reducido de proteína de la célula huésped (HCP), preferiblemente menos de 100 ppm de HCP, comprendiendo el método una primera etapa de purificación que comprende las etapas de:

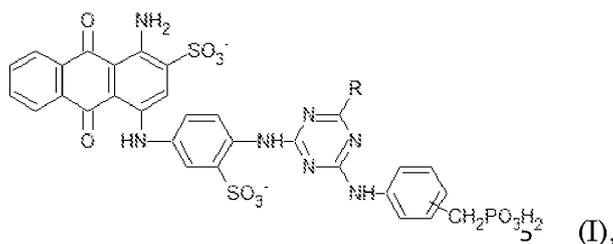
- proporcionar una fase sólida que comprende un ligando que tiene la fórmula:



- en la que R denota un espaciador que une el ligando a la fase sólida,
- poner en contacto dicho ligando con una composición que comprende una AP aislada que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y una HCP,
 - realizar varias etapas de lavado, donde al menos una etapa de lavado se realiza usando un regulador de lavado capaz de separar al menos parte de la HCP del ligando mientras se retiene al menos parte de la AP unida al ligando, y
 - obtener AP usando un regulador de elución capaz de separar al menos parte de dicha AP del ligando. Preferiblemente, al menos parte de la HCP se retiene unida al ligando o en la fase sólida, mientras se realiza esta última etapa.

El porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico, o el término "% de identidad de secuencia", se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácido o ácido nucleico candidata que es idéntica a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. Preferiblemente, el cálculo de dicho porcentaje de identidad de secuencia se lleva a cabo sin introducir huecos. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, "Align 2" o el servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

El DSP comprende una etapa de purificación que implica purificación por afinidad, usando un ligando conocido para una fosfatasa alcalina que tiene la fórmula:



en la que R es un grupo reactivo o un espaciador que está unido a una fase sólida, en el que las etapas de lavado se han optimizado para lograr alta pureza y rendimiento con contenido reducido de HCP para optimizar la estabilidad física de la composición resultante que contiene AP. El ligando de fórmula (I) está, en forma de columna, comercialmente disponible bajo la marca comercial Mimetic Blue AP^{MR} (MMBAP; Prometic, Reino Unido), donde R es una molécula espaciadora que sirve para crear una distancia entre la matriz de fase sólida de la columna y el ligando. Esta distancia permite la unión eficiente de la molécula grande de AP al ligando.

El ligando de fórmula I es conocido en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Lindner y col. (J Chromatography, 473 (1989) 227-240; Figura 1, compuesto IV) para la purificación de fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP). Lindner y col. han demostrado que el ligando es útil en el DSP de la fosfatasa alcalina intestinal (ALPI). Sin embargo, Lindner no describe la reducción de HCP, entre otros, ya que Lindner no se enfrentó al problema de la contaminación con HCP porque no purificaron la AP para uso terapéutico. Utilizando reguladores estándar de lavado y elución para la purificación, Lindner y col. lograron una purificación de 330 veces de CIAP. Sin embargo, como descubrieron los inventores, las condiciones enumeradas en Lindner, no resuelven el problema de la formación de partículas y la contaminación por HCP observadas durante el DSP para la fabricación farmacéutica.

Para la presente solicitud, con "célula huésped" se entiende una célula animal o humana que contiene un gen de AP activo (opcionalmente modificado) y este gen de AP se transcribe y traduce en la célula, ya sea *in vivo* (por ejemplo, en un animal humano) o *in vitro* (cultivo celular). El gen de AP puede introducirse en esta célula huésped como un gen exógeno, preferiblemente con elementos reguladores, que ya estaba presente en la célula huésped como un gen endógeno activo o se activa como un gen inactivo endógeno. Tal activación de genes endógenos puede conseguirse, por ejemplo, mediante la introducción específica de elementos de regulación en el genoma, por ejemplo mediante recombinación homóloga.

Las células de mamífero se usan habitualmente como células huésped. Si se introduce un gen de AP exógeno, se pueden utilizar, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) o de riñón embrionario humano (HEK) como células huésped. Las HCP pueden estar presentes en una preparación obtenida a partir de una célula animal (no modificada) que expresa una AP endógena, en cuyo caso la proteína AP obtenida se designa típicamente como "purificada" o "aislada". Por el contrario, una proteína "recombinante" generalmente se considera una proteína expresada por una célula que comprende un gen de AP exógeno, opcionalmente modificado, o por una célula que expresa AP mediante recombinación homóloga, como se definió anteriormente. Una proteína recombinante también se puede denominar "aislada", por ejemplo, cuando se purifica. Debe entenderse que el método de acuerdo con la invención se puede usar tanto para AP expresada endógenamente como expresada de forma recombinante. Debe observarse que el término "aislado" y "purificado" puede usarse en el curso del DSP de una proteína recombinante para indicar las diferentes etapas de purificación, tales como el aislamiento de las células y la purificación de la proteína para eliminar contaminantes. Tal como se usa en la presente solicitud, el término aislado y purificado puede tener el último significado, dependiendo del contexto de uso de estos términos.

Para una composición que comprende una fosfatasa alcalina recombinante novedosa y mejorada, sin embargo, los métodos de purificación estándar no condujeron a una eliminación suficiente de HCP. Además, las pruebas comerciales que se utilizaron para la medición de HCP subestimaron el contenido de HCP, especialmente debido al hecho de que la AP se purificó conjuntamente con la HCP, entre otros porque ambas tienen un punto isoeléctrico similar y posiblemente porque la HCP se unió a la AP durante la purificación. La presencia de la HCP en la composición dio como resultado adicionalmente la formación de partículas que también es una aparición no deseada en una composición farmacéutica, entre otras cosas porque las partículas pueden comprender agregados de proteínas insolubles, que son más inmunogénicas que las proteínas solubles.

Los inventores, ahora enfrentados con los problemas, de que la composición destinada para uso farmacéutico contenía una concentración relativamente alta de HCP, y partículas formadas durante el almacenamiento, buscaron una solución.

Un problema a resolver es, por lo tanto, la provisión de una composición que comprende una fosfatasa alcalina recombinante particular, composición que comprende un bajo contenido de HCP y preferiblemente no muestra formación visible de partículas durante la prueba de estabilidad a 2-8°C durante 2 meses. Con la formación de partículas visibles se quiere indicar que la partícula o partículas pueden observarse a simple vista por un experto en la técnica, usando opcionalmente un medio de amplificación, tal como una lupa. En el mundo de la regulación, existe una distinción entre material particulado visible y no visible. Las partículas visibles se definen libremente como cualquier partícula que

pueda detectarse a simple vista. Normalmente, los objetos visibles se definen como objetos de 0,05 mm o más. Con el término "partículas visibles", como se usa en la presente invención, se entiende: partículas que son de 0,05 mm o más grandes, preferiblemente de 0,1 mm o más grandes, más preferiblemente de 0,2 mm o más grandes, más preferiblemente de 0,5 mm o más grandes, más preferiblemente de 1 mm o más grandes.

También es posible detectar la formación de partículas visibles con equipos diseñados para detectar tales partículas visibles. El enfoque más común para automatizar la inspección de partículas en una solución transparente, tal como con la composición (obtenida mediante un método) de acuerdo con la invención, es agitar la solución y tomar imágenes de la solución a lo largo del tiempo. El sistema de obtención de imágenes generalmente consiste en una cámara de visión, iluminación (en este caso, luz de fondo) y un procesador de visión para analizar las imágenes. Una vez que las imágenes han sido adquiridas, luego se analizan en secuencia para observar las diferencias de una imagen a otra. Las diferencias se pueden interpretar como objetos que se mueven dentro de la solución, como burbujas de gas y partículas. En el caso de partículas más grandes y más densas, la detección se logra filtrando las burbujas de gas del análisis, ya que se generarán mientras el material en partículas se hunde.

Si el objetivo es encontrar material particulado, más pequeño que aproximadamente 1 mm de diámetro, se debe usar un enfoque de agitación más cuidadoso para eliminar las burbujas de gas del campo de visión. Esto se puede hacer agitando la solución mediante centrifugado, prestando especial atención a las velocidades de aceleración y desaceleración.

Para el propósito de la presente invención, sin embargo, el método de detección no es importante para definir "partículas visibles" siempre que las partículas tengan un diámetro como se definió anteriormente.

Como se describió anteriormente, el DSP estándar y la formulación para la fosfatasa alcalina recombinante no dieron como resultado una composición tal que el contenido de HCP excediera ampliamente la norma generalmente usada de 100 ppm y durante la prueba de estabilidad, se observó la formación de partículas.

Para cumplir con las normas reguladoras, un método para obtener una composición de acuerdo con la invención da como resultado una composición que comprende menos de 100 ppm de HCP, con relación al contenido de fosfatasa alcalina. Preferiblemente, el regulador de lavado comprende además $MgCl_2$, $ZnCl_2$ y Tris. Estos componentes no son necesarios para eliminar la HCP durante la etapa de lavado, pero son beneficiosos para las propiedades de estabilidad de la fosfatasa alcalina en general, ya que la AP es una enzima de unión al metal sensible al pH. Preferiblemente, el Mg está presente a una concentración superior a 0,1 mM. Preferiblemente, la concentración de Mg no excede de 100 mM. La concentración de Mg está preferiblemente entre 0,1-100 mM, más preferiblemente entre 0,5-20 mM, más preferiblemente entre 1-5 mM, lo más preferiblemente alrededor de 2 mM. El Zn está presente preferiblemente en una concentración por encima de 10 μM . Preferiblemente, la concentración de Zn no supera 1 mM. La concentración de Zn está preferiblemente entre 10-1.000 μM , más preferiblemente entre 20-100 μM , más preferiblemente entre 40-60 μM , más preferiblemente alrededor de 50 μM .

La fase sólida puede ser, por ejemplo, una resina y típicamente está en forma de columna, que como tal está disponible comercialmente. Se prefiere el uso de una columna en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención ya que es fácilmente ampliable en una configuración de DSP. Una columna adecuada en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención es, por ejemplo, Mimetic Blue AP®. Sin embargo, también es posible usar, por ejemplo, perlas que comprenden dicho ligando y realizar las etapas de puesta en contacto y lavado a través de centrifugación, decantación y disolución. También es posible usar perlas magnéticas y separación magnética durante las etapas de lavado. Una persona experta en la técnica está familiarizada con los diferentes procesos para la purificación por afinidad y puede adaptar fácilmente dichos procesos para usar en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención.

Típicamente, el ligando se une a la fase sólida usando un espaciador, representado por R en la fórmula (I). Tales espaciadores son conocidos en la técnica y cualquier espaciador adecuado, tal como hexametil diamina (1,6-diaminohexano) (Dye-Ligand Affinity Absorbents for Enzyme Purification N.E. Labrou Molecular Biotechnology Vol 20, 2002 p77-84) o 3',3'-diaminodipropilamina. Preferiblemente, el regulador de lavado comprende entre 20-100 mM de Arg, preferiblemente entre 30-50 mM de Arg, más preferiblemente alrededor de 40 mM de Arg.

Los inventores han demostrado sorprendentemente que incorporando la etapa de lavado anterior en el proceso de DSP estándar para AP, ahora es posible disminuir el contenido de HCP a un valor por debajo de 100 ppm en la composición final. La etapa de lavado descrita permite así la provisión de una composición que cumple con las normas establecidas para la composición farmacéutica a este respecto y, como tal, tiene un contenido de menos de 100 ppm de HCP. Dicha composición no pudo obtenerse antes de la presente invención, porque las etapas estándar (optimizadas) de DSP que no hicieron uso de las etapas novedosas e inventivas de DSP de la presente invención, no dieron como resultado una composición que comprende menos de 100 ppm de HCP. Además, dicha composición, cuando se almacena a 2-8°C durante 2 meses, no muestra formación visible de partículas, mientras que las composiciones preparadas mediante etapas de DPS optimizadas estándar sí lo hacen.

Los inventores han demostrado además que un regulador de lavado que comprende entre 0,5-2 M de urea,

preferiblemente entre 1 y 2 M de urea, más preferiblemente aproximadamente 1 M de urea, cuando se usa en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, dio como resultado también un contenido reducido de HCP. Un regulador de lavado que comprende tanto urea como Arg también dio muy buenos resultados. Además, se divulga un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, en el que el regulador de lavado comprende entre 0,5-2 M de urea, preferiblemente entre 1-2 M de urea, más preferiblemente aproximadamente 1 M de urea. Preferiblemente, el regulador de lavado comprende tanto Arg como urea en una concentración como se describió anteriormente.

La adición de 5-15%, preferiblemente aproximadamente etilenglicol al 10%, al regulador de lavado también proporcionó buenos resultados. Por lo tanto, se divulga un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, en donde el regulador de lavado comprende entre 5-15% de etilenglicol, preferiblemente aproximadamente etilenglicol al 10%. Se muestra adicionalmente en el presente documento que para aumentar la reducción de HCP y/o mejorar el rendimiento de la AP, el regulador de lavado está preferiblemente libre de NaCl. Preferiblemente, por lo tanto, se proporciona un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, en el que el regulador de lavado, que comprende preferiblemente Arg, urea, etilenglicol o cualquier combinación de los mismos en una concentración como la descrita anteriormente, está sustancialmente libre de NaCl. Con sustancialmente libre de NaCl se entiende que el regulador de lavado comprende preferiblemente menos 1 mM, más preferiblemente menos de 100 μ M, más preferiblemente menos de 10 μ M, más preferiblemente menos de 1 μ M, más preferiblemente menos de 100 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, más preferiblemente menos de 1 nM de NaCl.

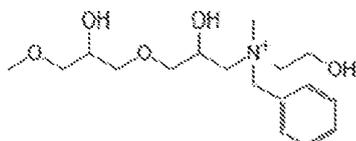
Con contenido reducido se entiende que, la relación HCP:AP es menor después de emplear un método de acuerdo con la invención cuando se compara con un método similar en el que no se usa Arg, urea o etilenglicol durante el lavado y en el que el NaCl está presente en un cantidad sustancial (por ejemplo, más de 1 mM) en el regulador de lavado. Preferiblemente, un método de acuerdo con la invención, cuando se incorpora al conjunto completo de etapas de DSP da como resultado un contenido de HCP, relativo al contenido de AP, de menos de 100 ppm, más preferiblemente menos de 50 ppm, más preferiblemente menos de 20 ppm, más preferiblemente menos de 10 ppm, más preferiblemente menos de 5 ppm, más preferiblemente menos de 2 ppm, más preferiblemente menos de 1 ppm.

De manera similar, con un rendimiento mejorado se quiere indicar que el rendimiento de AP, medido en porcentaje de AP_{fuera} frente a AP_{dentro} es mayor, en relación con un método que no usa una etapa de lavado de acuerdo con la invención, en donde AP_{fuera} es la cantidad de AP que se obtiene después de la etapa del proceso y AP_{dentro} es la cantidad de AP que se pone en contacto con el ligando antes del lavado.

Junto a la etapa de lavado en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, la etapa de elución también se ha mejorado con respecto a los métodos conocidos en la técnica antes de la presente invención. Por consiguiente, el regulador de elución utilizado en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención comprende preferiblemente menos de 100 mM de NaCl para separar eficazmente al menos parte de la AP del ligando que tiene estructura de fórmula (I). Los mejores resultados se han logrado usando la combinación de un regulador de lavado que comprende aproximadamente 40 mM de Arg, que tiene un pH de aproximadamente 8 y está sustancialmente libre de NaCl, y un regulador de elución que está preferiblemente sustancialmente exento de NaCl. Preferiblemente, se proporciona un método para obtener una composición de acuerdo con la invención, en el que el regulador de lavado comprende aproximadamente 40 mM de Arg y tiene un pH de aproximadamente 8, y en el que tanto el regulador de lavado como el regulador de elución están sustancialmente libres de NaCl. Con sustancialmente libre de NaCl se entiende que el regulador de lavado y/o el regulador de elución comprenden preferiblemente menos de 1 mM, más preferiblemente menos de 100 μ M, más preferiblemente menos de 10 μ M, más preferiblemente menos de 1 μ M, más preferiblemente menos de 100 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, lo más preferiblemente menos de 1 nM de NaCl.

Junto a la etapa de DSP de afinidad descrita anteriormente, el DSP completo para (una) fosfatasa alcalina comprende típicamente etapas adicionales para la purificación. Una de tales etapas es la llamada etapa de purificación de modo mixto usando un ligando como se describe por la fórmula estructural (II) a continuación. El ligando se conoce en la técnica como "Capto Adhere" y combina tanto la interacción hidrófoba como la purificación de intercambio iónico. Los presentes inventores han adaptado las condiciones de lavado mientras realizan la etapa de purificación en modo mixto para disminuir aún más el contenido de HCP con rendimiento óptimo. Preferiblemente, un método para obtener una composición de acuerdo con la invención comprende además una segunda etapa de purificación, que comprende las etapas de:

- proporcionar una segunda fase sólida que comprende un segundo ligando que tiene la fórmula:



(II),

- poner en contacto dicho segundo ligando con una composición que comprende una AP aislada y una HCP, y

- realizar varias etapas de lavado, donde al menos una etapa de lavado se realiza utilizando un segundo regulador de lavado que tiene un pH entre 7,5-8,5, preferiblemente entre 7,8 y 8,2, más preferiblemente alrededor de 8,0, y que comprende entre 0,05 y 0,2 M de NaCl, preferiblemente alrededor de NaCl 0,1 M y entre 0,1 y 0,5 M de L-Arg, preferiblemente entre 0,15 y 0,3 M de L-Arg, más preferiblemente alrededor de 0,2 M de L-Arg. En una realización preferida, dicho segundo regulador de lavado comprende además entre 1-20%, preferiblemente entre 2-10%, más preferiblemente entre 4-6%, lo más preferiblemente alrededor de glicerol al 5%.

La fase sólida puede ser, nuevamente, por ejemplo una resina y típicamente está en forma de una columna, que como tal está disponible comercialmente. Se prefiere el uso de una columna en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención ya que es fácilmente ampliable en una configuración de DSP. Una resina adecuada en un método para obtener una composición de la invención es, por ejemplo, Capto-Adhere®, que puede usarse en forma de columna. Sin embargo, también es posible usar, por ejemplo, perlas que comprenden dicho ligando y realizar las etapas de puesta en contacto y lavado a través de centrifugación, decantación y disolución. También es posible usar perlas magnéticas y separación magnética durante las etapas de lavado. Una persona experta en la técnica está familiarizada con los diferentes procesos para la purificación por afinidad y puede adaptar fácilmente dichos procesos para usar en un método para obtener una composición de acuerdo con la invención.

Aunque la secuencia de las etapas de DSP puede variarse para adaptarse para procesar eficientemente la composición, en una realización preferida, dicha segunda etapa de purificación precede, es decir, se realiza antes, de dicha primera etapa de purificación. El DSP completo para la fosfatasa alcalina puede incluir, preferiblemente, otras etapas de purificación, conocidas en la técnica, tales como cromatografía de intercambio aniónico, ultrafiltración/diafiltración, filtración viral, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad y cromatografía de interacción hidrófoba, y cualquier combinación de las mismas.

En una realización preferida, el método para obtener una composición de acuerdo con la invención comprende al menos tres, preferiblemente al menos cinco, más preferiblemente todas las etapas siguientes, preferiblemente en el orden que se detalla a continuación:

- Cromatografía de modo mixto (por ejemplo, Capto Adhere (fórmula II))
- Inactivación viral basada en detergente (por ejemplo, Triton X-100)
- Cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Poros 50 HQ)
- Cromatografía de afinidad (por ejemplo, Mimetic Blue AP (fórmula I))
- Cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, Butyl 650 M)
- Ultrafiltración/Diafiltración
- Filtración de virus
- Llenado a granel

La presente invención describe una etapa de formulación que da como resultado una estabilidad física mejorada de una composición de AP aislada, que preferiblemente ya tiene un contenido reducido de HCP, de forma que se produce una formación reducida de partículas, preferiblemente formación de partículas visibles durante la prueba de estabilidad. Preferiblemente, un método para producir una composición de acuerdo con la invención que comprende una fosfatasa alcalina aislada y que comprende un contenido reducido de HCP precede a dicha etapa de formulación. Preferiblemente, dicha etapa de formulación comprende la disolución o dilución de la AP eluida en un regulador de manera que la composición resultante tenga un pH de entre 6,5 y 7,5, preferiblemente entre 6,8 y 7,2, más preferiblemente alrededor de 7,0, preferiblemente comprendiendo entre 200 y 300 mM de sorbitol, más preferiblemente entre 225-275 mM de sorbitol, más preferiblemente aproximadamente 250 mM de sorbitol, y/o que comprende entre 10-40% de glicerol, más preferiblemente entre 20-30% de glicerol, lo más preferiblemente aproximadamente 2glicerol al 5%. En una realización preferida, la composición comprende entre 10-40 mM de citrato, más preferiblemente entre 15-30 mM de citrato, más preferiblemente alrededor de 20 mM de citrato. Alternativamente, la composición comprende entre 5-40 mM de histidina, más preferiblemente entre 10-30 mM de histidina, más preferiblemente entre 15-25 mM de histidina, más preferiblemente aproximadamente 20 mM de histidina. Por lo tanto, aquí se describe un método para producir una composición físicamente estable que comprende una fosfatasa alcalina aislada (AP), comprendiendo el método disolver o diluir AP en un regulador, dando como resultado una composición que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5 y que preferiblemente comprende entre 200-300 mM de sorbitol y/o entre 10-40% de glicerol. Preferiblemente, dicha composición comprende entre 5-40 mM de histidina y/o entre 10-40 mM de citrato. La composición que comprende AP de acuerdo con la invención comprende menos de 100 ppm de HCP. Preferiblemente, dicha composición comprende la AP eluida obtenida mediante un método divulgado en el presente documento para producir una composición que comprende una fosfatasa alcalina aislada y que comprende un contenido reducido de HCP. Por lo tanto, en la presente invención se describe un método para producir una composición de acuerdo con la invención que comprende una fosfatasa alcalina aislada y recombinante y que comprende un contenido reducido de HCP, que comprende además la etapa de disolver o diluir la AP obtenida allí en un regulador, dando como resultado una composición que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5, preferiblemente entre 6,8 y 7,2, más preferiblemente alrededor de 7,0, y preferiblemente comprendiendo entre 200-300 mM de sorbitol, más preferiblemente entre 225-275 mM de sorbitol, más preferiblemente alrededor de 250 mM de sorbitol y/o entre 10-40% de glicerol, más preferiblemente entre 20-30% de glicerol, lo más preferiblemente aproximadamente 2glicerol al 5%. En una realización preferida, la composición comprende entre 10-40 mM de citrato, más preferiblemente entre 15-30 mM de citrato, más preferiblemente alrededor de 20 mM de citrato, y/o entre 5-40 mM

de histidina, más preferiblemente entre 10-30 mM de histidina, más preferiblemente entre 15-25 mM de histidina, más preferiblemente aproximadamente 20 mM de histidina.

5 Preferiblemente, el regulador en el que la AP se disuelve o diluye para obtener la composición comprende una sal de magnesio (Mg), tal como $MgCl_2$ y/o una sal de zinc (Zn), tal como $ZnCl_2$. Preferiblemente, el Mg está presente en la composición en una concentración de más de 0,1 mM. Preferiblemente, la concentración de Mg no excede de 100 mM. La concentración de Mg está preferiblemente entre 0,1-100 mM, más preferiblemente entre 0,5-20 mM, más preferiblemente entre 1-5 mM, lo más preferiblemente alrededor de 2 mM. El Zn está presente preferiblemente en una concentración por encima de 10 μM . Preferiblemente, la concentración de Zn no supera 1 mM. La concentración de Zn está preferiblemente entre 10-1.000 μM , más preferiblemente entre 20-100 μM , más preferiblemente entre 40-60 μM , más preferiblemente alrededor de 50 μM . Como se discutió anteriormente, las sales de Mg y Zn no necesariamente influyen en la estabilidad física de la composición en términos de formación visible de partículas, pero, al ser una enzima coordinadora de metales, AP es en general más estable cuando están presentes los iones Zn y Mg. La composición puede comprender además NaCl, preferiblemente en una concentración fisiológica, es decir, aproximadamente 0,9% p/v de NaCl. Esto es especialmente útil cuando la composición se usa como medicamento, en particular cuando se usa para administración intravenosa.

20 Aunque el método puede aplicarse también a otras proteínas recombinantes, un método para obtener una composición de acuerdo con la invención se realiza preferiblemente usando una composición que comprende una fosfatasa alcalina que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente que tiene al menos 95% de identidad de secuencia, más preferiblemente que tiene al menos 98% de identidad de secuencia, más preferiblemente que tiene al menos 99% de identidad de secuencia, lo más preferiblemente que tenga 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En una realización, la proteína de la célula huésped es una proteína de la célula huésped de mamífero, preferiblemente una proteína de tipo catepsina (catA), más preferiblemente un homólogo de la Catepsina A de hámster, y/o la fosfatasa alcalina recombinante se expresa en un sistema de expresión basado en células, preferiblemente que comprende una célula huésped de mamífero, más preferiblemente una célula huésped CHO. La invención proporciona una composición que comprende una fosfatasa alcalina aislada y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, caracterizada porque la composición comprende menos de 100 ppm de una proteína de la célula huésped, más preferiblemente menos de 50 ppm, más preferiblemente menos de 20 ppm, más preferiblemente menos de 10 ppm, más preferiblemente menos de 5 ppm, más preferiblemente menos de 2 ppm, lo más preferiblemente menos de 1 ppm o menos. La composición de la invención no muestra formación sustancial de partículas visibles durante la prueba de estabilidad a 2-8°C, preferiblemente a aproximadamente 5°C durante 2 meses, más preferiblemente durante 3 meses. Sin formación sustancial visible de partículas se entiende que se forman < 20 partículas visibles en 1 mL de la composición. Preferiblemente, se forman 15 o menos partículas, más preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 5 o menos, lo más preferiblemente menos de 1 partículas por 1 mL de composición durante la prueba de estabilidad en las condiciones especificadas para el almacenamiento de la composición.

40 Preferiblemente, la composición tiene un pH de entre 6,5-7,5, preferiblemente alrededor de 7 y preferiblemente comprende entre 10-40 mM, preferiblemente entre 15-30 mM, más preferiblemente alrededor de 20 mM de citrato y/o entre 10-40%, preferiblemente entre 20-30, más preferiblemente alrededor de 2glicerol al 5%, y/o entre 200-300 mM, preferiblemente entre 225-275 mM, más preferiblemente aproximadamente 250 mM de sorbitol, y/o entre 5-40 mM de histidina, preferiblemente entre 10-30, más preferiblemente aproximadamente 20 mM de histidina. En una realización preferida, la composición tiene un pH de entre 6,5-7,5, preferiblemente alrededor de 7 y comprende entre 10-40 mM de citrato, preferiblemente alrededor de 20 mM o entre 5-40 mM de histidina, preferiblemente alrededor de 20 mM. Los inventores han observado una excelente estabilidad física, es decir, ninguna formación sustancial de partículas visibles durante la prueba de estabilidad a 2-8°C durante 2 meses usando tal composición formulada. Como se describió anteriormente, el término "partícula visible" como se usa en la presente memoria denota partículas que tienen 50 μm de diámetro o más, preferiblemente 100 μm o más, más preferiblemente 500 μm o más, lo más preferiblemente 1 mm o más. Las partículas pueden observarse a simple vista, opcionalmente usando medios de aumento o mediante un proceso automático, tal como, por ejemplo, una cámara de película y medios adecuados para analizar el material de la película, como se describió anteriormente. La composición de acuerdo con la invención comprende una fosfatasa alcalina aislada que se ha expresado en un sistema de expresión basado en células, que comprende preferiblemente una célula huésped de mamífero, más preferiblemente que comprende una célula huésped CHO. En una realización preferida, la HCP es una proteína de tipo catepsina, más preferiblemente un homólogo de catepsina A de hámster.

60 Preferiblemente, la fosfatasa alcalina tiene una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia, lo más preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. La invención proporciona además una composición de acuerdo con la invención para uso como medicamento.

65 Una composición de acuerdo con la invención para uso como medicamento es preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con fosfatasa alcalina. Con las enfermedades relacionadas con fosfatasa alcalina se entiende, una enfermedad o condición que está relacionada con una deficiencia en fosfatasa alcalina, o una

enfermedad o afección que puede mejorarse mediante la administración exógena de fosfatasa alcalina. En particular, una enfermedad relacionada con la fosfatasa alcalina puede ser cualquiera de las siguientes enfermedades: sepsis o choque séptico, enfermedad inflamatoria del intestino u otras enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, lesión renal (aguda) u otras enfermedades renales, afecciones de reperfusión isquémica, traumatismo (quirúrgico) e hipofosfatasa.

5 La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Leyendas de las figuras

10 Figura 1. Formación de partículas en la composición de fosfatasa alcalina formulada en el regulador indicado los días 0-7. El eje y representa la formación cualitativa de partículas en la que: 1 = ~10 partículas/mL Y/O partículas más grandes; 2 = 10-15 partículas/mL Y/O partículas más grandes; 3 = ~15 partículas/mL Y/O partículas en su mayoría más grandes; 4 = 15-20 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 5 = ~ 20 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 6 = ~30 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 7 = 30-40 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 8 = 40-50 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes. Dentro de cada conjunto de barras (para cada conjunto dentro de A, dentro de B, dentro de C, etc.) el orden (de izquierda a derecha) como se indica en la leyenda, es decir, primera barra = día 0, segunda barra = día 1, etc. A, B, C, etc. denotan los diferentes excipientes, como se explica en la Tabla 2.

15 Figura 2. La formación de partículas en la composición de fosfatasa alcalina formulada en el regulador indicado el día 7. El eje y representa la formación cualitativa de partículas en la que: 1 = ~10 partículas/mL; 2 = 10-15 partículas/mL Y/O partículas más grandes; 3 = ~15 partículas/mL Y/O partículas en su mayoría más grandes; 4 = 15-20 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 5 = ~ 20 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 6 = ~30 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 7 = 30-40 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes; 8 = 40-50 partículas/mL Y/O partículas mucho más grandes.

20 Figura 3. Formación de partículas en la composición de fosfatasa alcalina formulada en los reguladores indicados. El eje y representa la formación cualitativa de partículas donde: 1 = no hay partículas visibles; 2 = 1-5 partículas pequeñas/mL; 3 = 6-15 partículas pequeñas/mL; y 4 = 16-25 partículas pequeñas/mL.

25 Figura 4. Efecto de las condiciones de estrés físico sobre la formación de especies de recAP de alto peso molecular (APM) en diferentes formulaciones. Representación gráfica del porcentaje del pico principal y el porcentaje de APM de la proteína recAP de acuerdo con lo determinado por la cromatografía de exclusión por tamaño.

30 Figura 5. Efectos de lavados intermedios con Capto Adhere en la eliminación de HCP y el rendimiento del producto para el cribado primario. (A) Representación gráfica de HCP normalizada (eluato normalizado con respecto al eluato inicial) frente al rendimiento del producto para cada eluato. El lavado intermedio probado en cada prueba se etiqueta con un círculo de color correspondiente a los presentados en el gráfico. (B) Tabla de los niveles residuales de HCP y rendimiento para cada experimento completado. La formulación de cada lavado intermedio analizado, así como los resultados de los datos de HCP residuales brutos, la HCP normalizada y el rendimiento del producto se enumeran para cada prueba. Los círculos de colores presentados en la tabla corresponden a las etiquetas en (A). Todas las formulaciones de regulador contenían $MgCl_2$ 2 mM y $ZnCl_2$ 50 μM .

35 Figura 6. Análisis de transferencia Western para la detección de catA dentro de muestras en proceso. (A) Se realizó una transferencia Western en condiciones no reductoras usando detección de anticuerpos catA para aproximadamente 10 μg de cada muestra en proceso. La identificación, incluida la HCP residual y el rendimiento, para cada muestra analizada se enumera en (B). El eluato del experimento de control de referencia (Carril 5) contenía más catA que los eluatos en los que se incluyó un lavado intermedio (Carriles 2 y 4). El carril 3 representa catA eliminado durante la etapa de lavado intermedio que contiene 0,5 M de $AmSO_4$, pH 8,0. Todas las formulaciones de regulador contenían Tris 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM y $ZnCl_2$ 50 μM .

40 Figura 7. Efectos de lavados intermedios con Capto Adhere del cribado secundario sobre la eliminación de la HCP y el rendimiento del producto. (A) Representación gráfica de HCP normalizada frente al rendimiento del producto para cada eluato. Los valores de HCP se normalizaron con respecto al eluato de referencia utilizando el mismo material de carga. El lavado intermedio probado en cada prueba se etiqueta con un círculo de color correspondiente a los presentados en el gráfico. (B) Tabla que resume los datos presentados en el gráfico. Se enumeran las condiciones del lavado de prueba intermedio y el material de carga para cada una de las operaciones experimentales. Los datos de HCP sin procesar, los valores de HCP normalizados y el rendimiento del producto para cada eluato también se enumeran. Los círculos de colores presentados en la tabla corresponden a las etiquetas en (A). Todas las formulaciones intermedias del regulador también contenían Tris 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM y $ZnCl_2$ 50 μM .

45 Figura 8. Análisis de transferencia Western anti-catA que compara candidatos prometedoros de los estudios de detección inicial y secundaria. (A) Transferencia Western con un anticuerpo contra HCP catA. (B) Tinción de plata de las muestras en proceso. (C) Identificación de la muestra para cada carril en la transferencia Western. Las cantidades de producto cargadas por carril están indicadas. Los valores de HCP resultantes para los eluatos también se enumeran. El eluato del experimento de control de referencia (Carril 3) contenía más catA que los eluatos donde se incluyó un lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 con (Carril 7) o sin (Carril 5) glicerol al 5%. Los carriles 4 y 6 representan el catA eliminado durante las diversas etapas de lavado intermedio que contienen NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 en presencia (Carril 6) o ausencia (Carril 4) de glicerol al 5%. Todas las formulaciones de regulador también contenían Tris 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM y $ZnCl_2$ 50 μM .

50 Figura 9. Efectos de los lavados intermedios de MBAP sobre la eliminación de HCP y el rendimiento del producto para el cribado primario. (A) Representación gráfica de la concentración de HCP frente al rendimiento del producto para cada eluato. (B) Tabla de los niveles de HCP y rendimiento para cada experimento completado. La formulación de cada regulador de lavado intermedio, los datos de HCP sin procesar, la HCP normalizada y el rendimiento del producto se

enumeran para cada prueba. Los círculos de colores presentados en la tabla corresponden a las etiquetas en (A). Solo el lavado con urea 1 M redujo significativamente la HCP mientras se mantenía un alto rendimiento.

Figura 10: SDS-PAGE y análisis de Transferencia Western; MBAP Run 1 (referencia) y Run 4 (lavado con Urea 1 M) de el cribado principal. (A) Análisis de SDS-PAGE con colorante Gelcode Blue. Los patrones Ejecutar 1 y Ejecutar 4 muestran patrones de bandas equivalentes. (B) transferencia Western con detección de anticuerpos catA. El eluato de control de referencia (Carril 4) contenía más catA que el eluato de Eje 4 (Carril 6). El carril 5 representa catA eliminado durante la etapa de lavado intermedio que contiene urea 1 M, pH 8,0.

Figura 11: Efectos de los lavados intermedios de MBAP sobre la eliminación de HCP y el rendimiento del producto para el cribado primaria. (A) Representación gráfica de la concentración de HCP frente al rendimiento del producto para cada eluato. (B) Tabla de los niveles residuales de HCP y rendimiento para cada experimento completado. La formulación de cada lavado intermedio ensayado, la concentración de NaCl de regulador eluido, el resultado de HCP, la HCP normalizado y el rendimiento del producto se enumeran para cada prueba. Los círculos de colores presentados en la tabla corresponden a las etiquetas en (A). Todas las formulaciones regulador intermedias preparadas contenían Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM y ZnCl₂ 50 µM.

Figura 12: SDS-PAGE y análisis de transferencia Western de múltiples pruebas de cribado de lavado de eliminación de HCP (A) Tabla de carga de gel con la concentración de muestra y los datos de HCP por ELISA. (B) Transferencia Western con detección de anticuerpos catA. (C) Análisis de SDS-PAGE con tinción de plata.

Figura 13: Efectos de los lavados intermedios de MBAP sobre la eliminación de HCP y el rendimiento del producto para las pruebas de refinado de la etapa de lavado final. (A) Representación gráfica de la concentración de HCP frente al rendimiento del producto para cada eluato. El círculo rojo resalta el resultado de la prueba 28. (B) Tabla de los niveles de HCP y rendimiento para cada experimento completado. Se enumera la formulación de cada regulador de lavado intermedio, así como los resultados de los datos de HCP sin procesar, la HCP normalizada y el rendimiento del producto para cada prueba. Los círculos de colores presentados en la tabla corresponden a las etiquetas en (A). El regulador de lavado con arginina 40 mM mostró la mayor eliminación de HCP con alta recuperación de recAP con una carga de 3 g de recAP/L de resina (prueba 28, resaltado en amarillo).

Figura 14. Análisis de transferencia Western anti-catA de procesos intermedios de prueba de confirmación. (A) Transferencia Western con un anticuerpo contra HCP catA. (B) Tinción de plata de las muestras en proceso. (C) Identificación de la muestra para cada carril en la transferencia Western. La carga de la muestra para la transferencia Western y la tinción de plata están incluidas.

Figura 15: Resultados analíticos de reducción de HCP. Ejecución de confirmación, proceso intermedio y BDS.

Figura 16. Resumen de las pruebas analíticas para cada proceso intermedio de recuperación y purificación para la prueba de demostración. Resultados analíticos para los procesos intermedios de la prueba de demostración.

Figura 17. Ensayo de estabilidad para hasta 3 meses de formulaciones obtenidas en el Ejemplo 3 formuladas en regulador de histidina y regulador de citrato.

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de una fosfatasa alcalina recombinante mejorada.

Ejemplos

Definiciones usadas en los ejemplos

AmSO₄: sulfato de amonio; AP: fosfatasa alcalina; AU: unidades de absorbancia; BDS: sustancia farmacéutica a granel; BH: altura de lecho; BPC: contenedor de bioprocesos; catA: proteína de tipo catepsina; CCH: recolección de cultivo celular; CHO: ovario de hámster chino; CV: volumen de columna; ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; EQ: equilibrio; HCP: proteína de la célula huésped; HIC: cromatografía de interacción hidrófoba; APM: especies de alto peso molecular; ID: diámetro interno; L-Arg: L-Arginina; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MBAP: resina para fosfatasa alcalina Mimetic Blue; NaSCN: tiocianato de sodio; PD: desarrollo del proceso; PES: polietersulfona; ppm: partes por millón; PSI: libras por pulgada cuadrada; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; recAP: fosfatasa alcalina recombinante; RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa; SEC-HPLC: cromatografía de exclusión por tamaño-HPLC; SDS-PAGE: electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio); TMP: presión transmembrana; UDFD: ultrafiltración/diafiltración; v/v: volumen a volumen; WFI: agua para inyección.

Equipos utilizados en los ejemplos

AKTA Avant; AKTA Bioprocess skid (GE Healthcare); Proceso AKTA; Purificador AKTA; Espectrofotómetro UV-Vis BioPhotometer Plus (Eppendorf); columnas de cromatografía BPG de 10 cm y 14 cm de diámetro (GE Healthcare); espectrofotómetro UV-Vis Eppendorf Plus; minicentrífuga Fisher Scientific; báscula de piso (Ohaus); minicelda Novex de Invitrogen; medidor múltiple de conductividad y pH Mettler Toledo Seven; columnas Millipore Vantage-L; bomba peristáltica (Millipore); centrífuga de cubo oscilante;

Materiales utilizados en los ejemplos

BPC de 10 L (Hyclone); BPC de 20 L (Hyclone); BPC de 100 L (Hyclone); geles de SDS Bis-Tris al 4-12% de Invitrogen; filtro de fibra hueca 15N Planova (Asahi Kasei); BPC de 5 L (Hyclone); ácido acético; resina Butyl 650M (Tosoh Bioscience); resina Capto Adhere (GE Healthcare); D-sorbitol; etanol; L-arginina; clorhidrato de L-arginina; L-histidina; cloruro de magnesio hexahidratado; resina para AP Mimetic Blue (ProMetic Biosciences, Ltd.); Ultrafiltración Pellicon 2

Biomax 10 kDa 0,1 m² (Millipore); cartucho UF/DF Pellicon Biomax 10 kDa 50 cm² (Millipore); filtro viral Planova 15N (Asahi Kasei); resina Poros 50 HQ (Applied Biosystems); cloruro de sodio; hidróxido de sodio, 50%; fosfato de sodio; clorhidrato de tris; trometamina; base Tris; clorhidrato de Tris; WFI (Hyclone); cloruro de zinc.

5 Ejemplo 1

Estudios de estabilidad de la formulación

10 Numerosos estudios de formulación para recAP han sido realizados por KBI BioPharma, EE.UU., la CMO contratada por AM-Pharma para el desarrollo y la fabricación del proceso. Una formulación inicial se basó en la utilizada para BIAP, una forma de AP desarrollada previamente por AM-Pharma. BIAP demostró ser extremadamente estable en un regulador Tris que contiene un alto nivel de glicerol (25-40%). La composición del regulador inicial fue la siguiente:

15 Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µm, glicerol al 25% (p/v) pH 8.
recAP está formulado en este regulador a razón de 10 mg/mL. La solubilidad máxima de recAP en este regulador no se ha establecido. Sin embargo, se han logrado concentraciones de recAP hasta de 35 mg/mL en Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µm, pH 8,2.

20 Estudios de robustez

Se realizó una primera estabilidad de formulación con un enfoque en

- Robustez al pH (7,5-8,5) y concentración de regulador Tris 5 frente a 50 mM
- Tipo y concentración del excipiente (glicerol al 25%, 2% frente a Sorbitol 250 mM)
- Capacidad de manejo con jeringa

Las muestras se analizaron por pH, DSC, DLS, osmolalidad, viscosidad.

30 Se observó una ligera disminución en la estabilidad física de la proteína recAP mediante DLS con pH decreciente en una formulación de glicerol al 25%. El diámetro promedio Z aumentó de 10 a 12 nm. La homogeneidad de la muestra disminuyó con el pH (Pdl de 0,12 a 0,33) y el ancho máximo de la distribución del tamaño de las partículas aumentó a partir de allí.

35 No se observaron tendencias en formulaciones de glicerol al 2% o sorbitol 250 mM.

La robustez del pH de las formulaciones 5 mM se consideró inadecuada, pero no se observaron problemas significativos.

40 A partir de estos estudios, el regulador de formulación para el recAP se cambió a:
Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µm, glicerol al 25% (p/v) pH 8

Estudios de degradación forzada

- Estrés térmico: incubación a 50°C durante 1 semana.
- Estrés por congelación/descongelación:
 - 2,5 mL congelado directamente en congelador a -75°C en 24 horas, luego descongelado a temperatura ambiente.
 - 2,5 mL congelado a 0,05°C/minuto en un liofilizador a -65°C, luego descongelado a 0,05°C/minuto a 25°C.
 - Exposición a 1, 3 o 5 ciclos de congelación/descongelación
- Estrés por agitación: mediante un soporte giratorio y sacudidas orbitales a temperatura ambiente durante 5 días.
- Desamidación/hidrólisis básica: muestra a pH ≥ 10 con base Tris 1 M, incubación a 37°C durante cinco días.
- Desamidación/hidrólisis ácida: muestra a pH ≤ 4 con HCl 1 N, incubación a 37°C durante cinco días.
- Oxidación: exposición a peróxido de hidrógeno al 0,04% (v/v) por 4 horas a 37°C.
- Fotoestabilidad: exposición a 8,00 klux de luz fría durante 150 horas, seguida de 10,0 watt hora/metro cuadrado de luz UV durante 20 horas

Todas las muestras se analizan por:

- SEC
- RP-HPLC
- Actividad (cinética)
- cIEF
- A280
- SDS-CGE

- PepMap con LC/MS.

Estudios acelerados de estabilidad

5 Se está llevando a cabo un estudio de estabilidad acelerada (véase la Tabla 1) usando sustancia farmacológica a granel a partir de la prueba de producción a escala 10 L/5-10 gramos. Las muestras de recAP se almacenan a -75°C, 2-8°C y 25°C y las muestras se prueban mensualmente.

10 En t = 2 meses, no se observaron efectos sobre el pH y la actividad. Algo de evaporación a 25°C es evidente por un aumento en el contenido de proteína y un aumento concomitante en la actividad volumétrica. El conjunto de datos de la prueba de las muestras T = 2 meses aún no está completo. Sin embargo, ha quedado claro que la formación de partículas continúa en estas muestras.

Tabla 1. Datos de estabilidad T = 1 mes

Método	Tiempo Cero	1 M, -75°C	1 M, 5°C	1 M, 25°C
SEC	% APM: 0,3% % Principal: 99,7%	% APM: 0,4% % Principal: 99,6%	% APM: 0,4% % Principal: 99,6%	% APM: 0,9% % Principal: 99,1%
A280	9,87 g/L de recAP	9,67 g/L de recAP	9,83 g/L de recAP	10,46 g/L de recAP
Apariencia	Líquido transparente e incoloro. Libre de partículas visibles	Líquido transparente e incoloro con aproximadamente 5-10 pequeñas partículas blancas visibles por mL	Líquido transparente e incoloro con aproximadamente 5-10 pequeñas partículas blancas visibles por mL	Líquido transparente e incoloro con aproximadamente 5-10 pequeñas partículas blancas visibles por mL
pH	8,01	7,88	7,87	7,83
Actividad (cinética)	4.351 U/mL	5.250 U/mL	5.324 U/mL	5.508 U/mL

15 Investigaciones sobre la formación y caracterización de partículas

Se observó recientemente formación de partículas en lotes de recAP que se produjeron a una escala de 10 gramos. Las partículas vuelven a aparecer días después de la filtración de 0,22 µm. Visualmente, las partículas parecen ser de naturaleza proteínica.

20 El análisis de distribución de tamaño indica una distribución de tamaño amplia. La filtración da como resultado una reducción de 100 veces de las partículas más grandes, pero solo una reducción de 10 veces en partículas más pequeñas.

25 Se realizó un primer estudio de reformulación en el que se evaluaron el pH (7,0-8,5), el tipo de regulador (citrato frente a Tris), la concentración del regulador (5 frente a 50 mM de Tris) y los aditivos (sorbitol, sacarosa, glicerol, NaCl y arginina) (véase la Tabla 2). Ninguna de las 26 formulaciones previene la formación de partículas después de la filtración. Sin embargo, parece haber una tendencia hacia una formación más rápida de partículas y un pH más alto.

30 Tabla 2. Actualización de la evaluación de partículas – Formulaciones con evaluación visual completa

#	Regulador	Excipiente	pH objetivo
A	Citrato 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM	Sacarosa 250 mM	7
B		Sorbitol 250 mM	
C		Glicerol al 25%	
D		NaCl 150 mM	
E		Arginina 150 mM	
F	Tris 50 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM	Sacarosa 250 mM	7,5
G		Sorbitol 250 mM	
H		Glicerol al 25%	
I		NaCl 150 mM	
J		Arginina 150 mM	
K	Tris 5 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM	Sacarosa 250 mM	8
L		Sorbitol 250 mM	
M		Glicerol al 25%	
N		NaCl 150 mM	
O		Arginina 150 mM	
P	Tris 50 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM	Sacarosa 250 mM	8
Q		Sorbitol 250 mM	
R		Glicerol al 25%	
S		NaCl 150 mM	

T		Arginina 150 mM	
U		Sacarosa 250 mM	
V		Sorbitol 250 mM	
W	Tris 50 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM	Glicerol al 25%	8,5
X		NaCl 150 mM	
Y		Arginina 150 mM	
Z		DS reunido, filtrado, intercambio previo de regulador	

Se asignaron a las apariencias de las muestras de cribado de la formulación una clasificación de 1 a 8 en el transcurso de 7 días en función del contenido de partículas (Tabla 3) y los resultados se representan en las Figuras 1 y 2.

Tabla 3. Puntuación de clasificación de partículas visibles

~10 partículas/mL	1
10-15 partículas/mL Y/O partículas más grandes	2
~15 partículas/mL Y/O partículas en su mayoría más grandes	3
15-20 partículas/mL, Y/O partículas mucho más grandes	4
~20 partículas/mL, Y/O partículas mucho más grandes	5
~30 partículas/mL, Y/O partículas mucho más grandes	6
30-40 partículas/mL, Y/O partículas mucho más grandes	7
40-50 partículas/mL, Y/O partículas mucho más grandes	8

5

Ejemplo 2

Desarrollo de la formulación de recAP

10 Se evaluaron tres formulaciones para evaluar la formación de partículas y la estabilidad/agregación de recAP durante la congelación-descongelación y el estrés térmico. Las formulaciones que se evaluaron se enumeran a continuación:

Histidina 20 mM, sorbitol 250 mM, ZnCl₂ 50 µM, MgCl₂ 2 mM, citrato 20 mM pH 7,0, sorbitol 250 mM, ZnCl₂ 50 µM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,0

15 Tris 50 mM, glicerol al 25%, ZnCl₂ 50 µM, MgCl₂ 2 mM, pH 8,0

La concentración de proteína objetivo para el estudio fue de 10 mg/mL. El estudio se realizó utilizando Demo 4 DS sin filtrar y filtrado (a través de una membrana de PES de 0,2 µm), como dos conjuntos separados de muestras. Las muestras de proteína se intercambiaron en regulador en los reguladores de la formulación usando filtros de celulosa regenerada Amicon Ultra 15, 10 k MWCO. Los filtros se enjuagaron con el regulador apropiado antes de la adición de proteína. Se agregó un total de 2 mL de recAP a cada dispositivo UF/DF. Se añadió un volumen de 10 mL del regulador especificado a la muestra y el volumen total se redujo a ~ 2 mL. El proceso fue repetido por un total de 4 ciclos. Las muestras formuladas se dividieron en tres alícuotas. Se colocaron alícuotas de 1 mL a 2-8°C y se monitorizaron para la formación de partículas a Tiempo Cero, 3 días y 1 semana. Dos alícuotas de 0,5 mL se estresaron: una se colocó a 50°C durante 1 semana y una se expuso a 5 ciclos de congelación-descongelación. Al final del estudio, se analizaron ambas muestras, las de 2 a 8°C y las sometidas a estrés mediante SEC, RP-HPLC y actividad.

20

25

Resultados de apariencia

30 En todos los puntos de tiempo, todas las muestras aparecieron claras e incoloras.

Antes del intercambio de regulador, Demo 4 DS sin filtrar apareció transparente e incoloro, con -50 partículas pequeñas por mL en el Tiempo Cero, y al final del estudio.

35 Antes del intercambio de regulador, Demo 4 DS filtrado apareció transparente e incoloro, sin partículas visibles a Tiempo Cero, y 4 partículas pequeñas por mL al final del estudio.

40 En muestras formuladas, la presencia de partículas varió de 1-5 partículas pequeñas visibles a -20 partículas visibles, con un número mayor de partículas observadas en las formulaciones de Tris/glicerol, tanto de material de partida filtrado como no filtrado (Figura 3).

Tabla 4. Porcentaje de pico principal y porcentaje de APM de proteína recAP de acuerdo con lo determinado por los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño SEC

Condición	Formulación	Porcentaje de área de MP	Porcentaje de área de APM
Control	Citrato/Sorbitol pH 7	99,5	0,5
Control	Citrato/Sorbitol pH 7, filtrado	99,6	0,4

Control	Histidina/Sorbitol pH 7	99,5	0,5
Control	Histidina/Sorbitol pH 7, filtrado	99,5	0,5
Control	Tris/Glicerol pH 8	99,5	0,5
Control	Tris/Glicerol pH 8, filtrado	99,5	0,5
Congelar-Descongelar	Citrato/Sorbitol pH 7	99,6	0,4
Congelar-Descongelar	Citrato/Sorbitol pH 7, filtrado	99,6	0,4
Congelar-Descongelar	Histidina/Sorbitol pH 7	99,6	0,4

(continuación)

Condición	Formulación	Porcentaje de área de MP	Porcentaje de área de APM
Congelar-Descongelar	Histidina/Sorbitol pH7, filtrado	99,6	0,4
Congelar-Descongelar	Tris/Glicerol pH 8	99,5	0,5
Congelar-Descongelar	Tris/Glicerol pH 8, filtrado	99,5	0,5
Congelar-Descongelar	Citrato/Sorbitol pH 7	99,0	1,0
Estrés por calor	Citrato/Sorbitol pH 7, filtrado	99,0	1,0
Estrés por calor	Histidina/Sorbitol pH 7	98,8	1,2
Estrés por calor	Histidina/Sorbitol pH 7, filtrado	98,9	1,1
Estrés por calor	Tris/Glicerol pH 8	97,9	2,1
Estrés por calor	Tris/Glicerol pH 8, filtrado	97,9	2,1

Las múltiples rondas de congelación y descongelación no inducen la formación de APM. El estrés térmico causa una formación limitada de APM en formulaciones a base de Citrato/Sorbitol e Histidina/Sorbitol. La formación significativa de APM es inducida por el estrés térmico en formulaciones basadas en Tris/glicerol (Tabla 4 y Figura 4).

Ejemplo 3

Estrategia de cribado de lavado intermedio

Se seleccionaron dos etapas de columna para el desarrollo de lavados intermedios específicos para proporcionar la eliminación de proteína de la célula huésped. Los lavados se enfocaron en preservar el rendimiento del producto mientras se disminuían significativamente los niveles de HCP en los eluatos de la columna. Los lavados intermedios se seleccionaron inicialmente en base al mecanismo de elución actual para la resina Capto Adhere de modo mixto o la resina Blue Mimetic de afinidad.

Tras la identificación de condiciones prometedoras en el cribado primario, se examinaron una serie de lavados que contenían moduladores de fase móvil específicos para identificar formulaciones de lavado que podrían interrumpir interacciones potenciales entre la HCP de tipo catepsina y el ligando de resina, las interacciones entre la HCP y el producto, o ambos. Los moduladores de fase móvil indicados en la Tabla 5 se investigaron singularmente, secuencialmente y en combinación.

Tabla 5. Listado de moduladores y sus efectos potenciales sobre interacciones entre HCP y ligando de resina, HCP y producto o ambos

Modulador	Efecto Modulador
NaSCN	Disminuye las Interacciones hidrófobas
Urea	Debilita los enlaces hidrógeno, caótopo
Glicerol	Debilita las interacciones hidrófobas
Etilen glicol	Debilita las interacciones hidrófobas y los enlaces hidrógeno
L-arginina	Debilita las interacciones hidrófobas, caótopo
NaCl	Disminuye las Interacciones hidrófobas

Las tres condiciones de lavado principales para cada etapa de columna se refinaron adicionalmente, seguido de la prueba de las etapas de columna en serie para demostrar los efectos aditivos. Luego se realizó una prueba a escala de laboratorio de todo el proceso de purificación para confirmar que las etapas de proceso refinado produjeron sustancia farmacológica a granel que cumplía con la especificación de HCP sin reducir la actividad específica de recAP o impactar severamente el rendimiento total del proceso. A lo largo de las investigaciones, el ELISA de HCP y la transferencia Western con detección de catA se utilizaron rutinariamente para controlar el nivel de eliminación de HCP con la incorporación de los diversos lavados intermedios para la comparación con una prueba de referencia.

Refinamiento pore cromatografía de Capto Adhere

Cribado por lavado intermedio primario

El objetivo de este estudio fue identificar un lavado intermedio para la etapa de columna de Capto Adhere capaz de romper las interacciones potenciales entre el producto y la impureza conocida de HCP, las interacciones entre la impureza de HCP y el ligando de resina o ambos sin interferir con la interfaz producto:ligando. La interrupción de las interacciones con la impureza de HCP resultaría en última instancia en una mayor pureza del producto. Por lo tanto, se utilizó un cribado inicial para probar varios lavados intermedios para la etapa de captura en Capto Adhere y examinar su capacidad para aumentar la eliminación de HCP. Los lavados intermedios utilizados en el cribado primario se seleccionaron con base en los mecanismos de elución existentes para la cromatografía en modo mixto que incluyen una combinación de interacciones electrostáticas perturbadoras, interacciones hidrófobas o una combinación de ambas. La inclusión de una etapa de lavado intermedio que contiene un modulador (es decir, agente caotrópico, modificador hidrófobo, sal o glicol alquílico) podría reducir cualquier interacción existente con la impureza de HCP al tiempo que deja intacta la interacción producto:ligando. Además de evaluar los efectos del modulador, se evaluaron a pH 7,0 y 8,0.

El material de carga para el cribado primario se eliminó de la cosecha del cultivo de células B02-14OCT2012 (es decir, carga 1 x 15 L CCH). Esta cosecha de cultivo celular incorporó la estrategia/suplementación de alimentación revisada adoptada en octubre de 2012 (1). Se realizó un experimento de control de referencia siguiendo el proceso establecido, donde la columna se lavó con 7,5 CV de un regulador de alta salinidad (Tris 20 mM, NaCl 0,25 M, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 8,0) seguido de un lavado de 3,0 CV con regulador de equilibrio (Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 8,0) (2). Los niveles residuales de HCP de la prueba de control se compararon con una serie de experimentos que incorporan reguladores de lavado intermedios, enumerados en la Figura 3 para un total de 5,0 CV inmediatamente después del lavado con carga elevada de 7,5 CV y antes del lavado de 3,0 CV con regulador de equilibrio. El producto para cada experimento de cribado se eluyó en flujo ascendente una vez que la absorbancia de UV280 alcanzó la condición de inicio de $\geq 1,75$ AU/cm seguido de la recolección para CV de 2,0.

La figura 5 resume las formulaciones de los lavados intermedios ensayados, así como los niveles de HCP y los rendimientos del producto. Los valores residuales de HCP presentados en el gráfico se normalizaron al eluato de referencia. El rendimiento del producto (determinado mediante el título de RP) y el nivel de eliminación de la HCP (determinado usando el ELISA de HCP) fueron las respuestas clave analizadas a lo largo de estos estudios de cribado. Los lavados intermedios que produjeron eluatos con mayor eliminación de HCP que la referencia se seleccionaron como candidatos prometedores para el lavado. Con base en esta estrategia, los resultados del cribado primario revelaron tres probables candidatos de lavado intermedio: (1) NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0, (2) urea 1 M, pH 8,0, y (3) AmSO₄ 0,5 M, pH 8,0. Todas las demás formulaciones de lavado intermedio ensayadas no lograron reducir los niveles de HCP residuales más del 20% en comparación con el control de referencia. La incorporación de la etapa de lavado intermedio impactó negativamente el rendimiento del producto en varios casos, incluido el experimento con la mayor eliminación de HCP (Figura 5). Sin embargo, un pequeño sacrificio en el rendimiento del producto puede justificarse por un impacto significativo en la eliminación de la HCP. Se planificó un cribado secundario de formulaciones adicionales de regulador para identificar un lavado intermedio capaz de equilibrar el rendimiento del producto y la eliminación de HCP para esta etapa de la columna.

La cantidad de la HCP residual específico, proteína de tipo catepsina, se controló por transferencia Western en condiciones no reductoras. La Figura 6 representa el efecto de incorporar dos de los lavados intermedios prometedores que contienen NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 o AmSO₄ 0,5 M, pH 8,0. La comparación del eluato del experimento de control (Carril 5) con los eluatos de los experimentos que incluyen los lavados intermedios (Carriles 2 y 4) confirmó la reducción de la impureza de catA. El carril 3 representaba la impureza proteica de tipo catepsina que se eluyó de la columna durante el lavado intermedio con AmSO₄ 0,5 M, pH 8,0. El lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 también demostró la eliminación de catA, sin embargo, la muestra de lavado no se incluyó en esta transferencia Western específica. En comparación con el eluato de referencia, hubo aproximadamente un 30% de reducción de la proteína similar a catepsina para el eluato que incorpora el lavado con AmSO₄ 0,5 M, pH 8,0 (Carril 4) y aproximadamente el 50% de reducción para el eluato que recibió el lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 (Carril 2). Los resultados de la transferencia Western fueron consistentes con los datos de ELISA de HCP presentados en la Figura 5, lo que confirma la fiabilidad de ambos ensayos para guiar el estudio de cribado.

Con base en los resultados compilados del rendimiento del producto y la eliminación de HCP (como se determinó mediante transferencia Western y ELISA de HCP), el candidato principal de lavado intermedio identificado a partir del cribado principal fue el NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0.

55 Cribado de lavado intermedio secundario

El cribado primario reveló un lavado intermedio (NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0) que fue capaz de proporcionar al menos una reducción del 50% en HCP residual. El rendimiento del producto se vio negativamente afectado por este lavado particular, por lo tanto, los reguladores de lavado intermedio que poseen moduladores que podrían reforzar potencialmente las interacciones proteína:ligando se incorporaron en un cribado secundario. Los reguladores de lavado intermedio más efectivos del cribado primario también se analizaron en secuencia y en combinación para evaluar sus efectos aditivos así como también diversos valores de pH (Figura 7).

65 Usando las condiciones de proceso anteriores, se realizó un experimento de control de referencia y los niveles de HCP se compararon con una serie de experimentos que incorporaban los reguladores de lavado intermedios descritos en la

Figura 7. Todos los experimentos que evaluaron la efectividad de un lavado intermedio incluyeron cuatro bloques de lavado: (1) un lavado de 7,5 CV con regulador altamente salino (Tris 20 mM, NaCl 0,25 M, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μM, pH 8,0), (2) lavado con 1,5 CV con regulador de equilibrio (Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μM, pH 8,0), (3) un lavado intermedio con 5,0 CV utilizando una de las formulaciones de regulador enumeradas en la Figura 7 y (4) un lavado de 3,0 CV con regulador de equilibrio (Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μM, pH 8,0) antes de la elución del producto. Para experimentos que poseen etapas de lavado intermedio secuenciales, los bloques de lavado se alteraron para incluir dos fases de lavado intermedio con 5,0 CV que se separaron mediante un lavado de 1,5 CV con regulador de equilibrio para evitar la mezcla de los reguladores de lavado intermedios. También se completó un experimento que incluyó una baja concentración de modulador en el material de carga de cosecha para identificar el potencial de aumento de unión producto:ligando. El producto de cada experimento de cribado se eluyó en flujo ascendente una vez que la absorbancia de UV280 alcanzó la condición de inicio de $\geq 1,75$ AU/cm seguido de la recolección para CV 2,0 (2).

Las formulaciones de los lavados intermedios ensayados, así como los niveles de HCP normalizados y los valores de rendimiento se presentan en la Figura 7. Los niveles de HCP normalizados se incluyeron en el gráfico (Figura 7A) cuando se utilizaron dos lotes diferentes de material de carga de cosecha en todo el cribado secundario. Los niveles residuales de HCP se normalizaron para la prueba de control de referencia utilizando el mismo material de carga de cosecha (es decir, una carga de CCH del PD de 1 x 15 L o 200 L) (1). Varias de las condiciones de lavado intermedias redujeron los niveles residuales de HCP mientras se mantenía la recuperación del producto pero el mayor resultado provino del lavado intermedio que contenía NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0. La incorporación de este lavado intermedio redujo la concentración de HCP residual 2,9 veces en comparación con el experimento de control de referencia. El eluato que incorpora lavados secuenciales con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 seguido de AmSO₄ 0,5 M, pH 8,0 también exhibió una eliminación significativa de HCP de hasta 2,5 veces en comparación con el eluato de referencia.

Como con el cribado primario, la cantidad de HCP residual de la proteína de tipo catepsina se controló mediante transferencia Western en condiciones no reductoras. La Figura 8 representa el efecto de incorporar el lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 con y sin glicerol al 5%. El lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 se había identificado durante el cribado primario. La comparación del eluato del experimento de control (Carril 3) con los eluatos de los experimentos que incluyen lavados intermedios (Carriles 5 y 7) confirmó la reducción de la impureza de catA. Los carriles 4 y 6 representaban la impureza de catA que se eluía de la columna durante el lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 en ausencia o presencia de glicerol al 5%, respectivamente. En comparación con el eluato de referencia, la inclusión de glicerol en el lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 demostró una eliminación de catA ligeramente superior hasta aproximadamente 65% en comparación con aproximadamente 50% para el eluato que incorpora el lavado intermedio sin glicerol. Estos resultados demostraron los efectos aditivos de combinar varios moduladores (es decir, glicerol, sal y arginina) en un único lavado intermedio.

Selección del lavado intermedio con Capto Adhere

Después de completar el estudio de cribado de lavado intermedio con Capto Adhere, los datos analíticos compilados, específicamente los resultados de ELISA de HCP y transferencia Western, se utilizaron para la selección del lavado intermedio para la etapa de captura con Capto Adhere (Figura 5, Figura 7 y Figura 8). A lo largo del estudio de cribado, dos lavados intermedios demostraron claramente una reducción significativa de HCP en comparación con la prueba de control de referencia. Los dos lavados intermedios fueron: (1) NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 y (2) NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0. La transferencia Western en la Figura 8 proporcionó una comparación directa de los eluatos de las pruebas que incorporan estos lavados intermedios. Ambos lavados intermedios proporcionaron una reducción significativamente mayor en la HCP específica, proteína similar a catepsina, en comparación con la prueba de referencia, sin embargo, el nivel de reducción fue ligeramente mayor en el eluato que recibió un lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0. Con base en los datos de ELISA de HCP, el eluato que recibió un lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0 se redujo aproximadamente 65% contra aproximadamente 46% con lavado con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 en comparación con el eluato de referencia. Además de una mayor eliminación de HCP, el rendimiento del producto fue mayor para el eluato que recibió el lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0. Dada la mayor eliminación de HCP y el rendimiento del producto, el lavado intermedio seleccionado para la etapa de la columna de Capto Adhere fue NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0.

El estudio de cribado para la etapa de la columna con Capto Adhere fue exitoso en la identificación de un lavado intermedio capaz de un nivel apreciable de reducción de HCP por encima del proceso de referencia. El lavado seleccionado para la eliminación de la impureza proteica de tipo catepsina durante la etapa de captura fue Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μM, pH 8,0 y se incorporará en el proceso refinado que contiene un 17,0 CV en el volumen total de lavado de la columna. Las condiciones refinadas de Capto Adhere se integrarán en un proceso a pequeña escala para confirmar que las condiciones optimizadas logran niveles de HCP significativamente reducidos en la secuencia del proceso.

Refinamiento de cromatografía Mimetic Blue AP

Cribado de lavado intermedio primario

El objetivo de este estudio fue identificar un lavado intermedio para la etapa de la columna de Mimetic Blue AP capaz de romper las interacciones potenciales entre el producto y la impureza de HCP conocida, las interacciones entre la impureza de HCP y el ligando de resina o ambos sin interferir con la interfaz producto:ligando. Mimetic Blue AP (MBAP) es un adsorbente sintético de afinidad desarrollado específicamente para la purificación de la fosfatasa alcalina. El ligando consiste en un cromóforo azul unido a un grupo funcional de ácido fosfónico. La unión entre recAP y el ligando se produce en ausencia de fosfato. La elución se logra cuando el fosfato se introduce en la fase móvil. La especificidad de este mecanismo de unión sugirió que un regulador de lavado podría formularse para romper la interacción recAP-HCP y/o la interacción resina-HCP y eliminar la HCP en la fase móvil mientras se mantiene la inmovilización de recAP sobre la resina hasta la elución con fosfato.

El experimento de cribado de lavado inicial consistió en ocho pruebas de cromatografía, cada una de las cuales incluía una etapa de lavado intermedio diferente. Se descubrió una limitación del método durante el desarrollo, a saber, que la presencia de una alta concentración de NaCl (130 mM) en la corriente de alimentación y los reguladores de lavado reducían la capacidad de la resina. Esta observación indicó que la atracción electrostática también está involucrada en el mecanismo de unión de MBAP, lo que sugiere que se trata de una resina de pseudo afinidad. Para mantener un alto rendimiento, la fuerza iónica del regulador de lavado intermedio estaría limitada por las interacciones electrostáticas que se producen en este modo de cromatografía.

El material de carga de columna Mimetic Blue AP se generó a partir de la cosecha de cultivo de células clarificada B02-14OCT2012. Esta cosecha de cultivo celular incorporó la estrategia/suplementación de alimentación revisada adoptada en octubre de 2012 (1). La cosecha se purificó mediante la captura con Capto Adhere y las etapas de cromatografía con Poros HQ de acuerdo con los métodos de purificación establecidos (2). Los eluatos de Capto Adhere y Poros HQ se analizaron para determinar el título, la actividad y la HCP residual. El eluato de Poros HQ resultante se evaluó como representativo del proceso y se usó como material de carga para las primeras doce pruebas con Mimetic Blue AP de esta investigación.

Se realizó un experimento de control de referencia de acuerdo con el método de purificación de MBAP establecido. El lote de resina Mimetic Blue AP FA0345 se empaquetó en una columna de 2,2 cm de diámetro hasta una altura de lecho de 16,2 cm, produciendo una columna de 61,6 mL. En el momento en que se realizó la prueba de MBAP de referencia, el título de la carga (eluato de Poros HQ diluido 2X) no se determinó. Por lo tanto, se utilizó el análisis UV280 para aproximar la concentración de la carga. Utilizando este valor aproximado, se calculó que 108 mL de carga proporcionaban una densidad de carga de recAP de 2 a 3 g de recAP/L de resina.

La columna se esterilizó en NaOH 0,5 M y se equilibró. Se cargaron 108 mL de eluato de Poros HQ diluido 2X en la columna. Para las pruebas de ensayo de cribado primario, la etapa de lavado de EQ posterior a la carga fue seguida por una etapa de lavado intermedio con ≥ 3 CV utilizando los reguladores de prueba enumerados en la Figura 9 para cada prueba. La prueba se controló para la elución de proteína durante la etapa de lavado. Después del lavado intermedio, la columna se lavó de nuevo con regulador de EQ para eliminar los componentes del regulador de lavado de prueba. El producto se eluyó con Tris 20 mM, fosfato 25 mM, NaCl 130 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μ M, pH 8,0. La recolección de eluato se realizó mediante un rango UV, ya que el pico ascendió a 25 mAU, hasta que descendió a 50 mAU. La columna se vació y esterilizó entre cada prueba. Los eluatos se analizaron para el título (RP-HPLC), actividad y HCP residual (ELISA de HCP y transferencia Western). Cualquier condición de lavado que reduzca la concentración de HCP residual en el eluato sin afectar significativamente el rendimiento se trasladaría a la fase de cribado secundaria de este estudio.

Los resultados de las pruebas de cribado primario se presentan en la Figura 9 y la Figura 10. Las condiciones de prueba de referencia lograron un rendimiento del 100% de recAP, y la concentración de HCP residual fue de 2.047 ppm. Cuatro condiciones de lavado intermedio (NaCl 100 mM, NaCl 200 mM, NaSCN 0,2 M y arginina 200 mM) causaron pérdidas considerables de producto durante la etapa de lavado. Los lavados con glicerol al 5% y etilenglicol al 10% no afectaron adversamente el rendimiento, pero tampoco mostraron una eliminación de HCP significativa en comparación con la prueba de referencia. La única condición que cumplió los criterios de alto rendimiento (90%) y reducción significativa de HCP (1.066 ppm) fue la etapa de lavado con urea 1 M (Prueba 4). La transferencia Western con detección de proteína de tipo catepsina (Figura 10B) demostró que el eluato de la Prueba 4 mostraba una banda de catA reducida en comparación con la prueba de referencia. La transferencia también detectó catA en el lavado con urea 1 M, lo que indica que el lavado fue efectivo para romper la asociación entre el recAP y esta especie de HCP, y/o resina y HCP. Este resultado confirmó los hallazgos del análisis ELISA de HCP.

Cribado de lavado intermedio secundario

El estudio de cribado secundario introdujo nuevas condiciones de lavado en un intento de mejorar tras la eliminación de HCP observada en las pruebas de cribado primario. El cloruro de sodio y la L-arginina se probaron nuevamente, pero a concentraciones más bajas que en las pruebas de cribado primario. La arginina había mostrado una eliminación selectiva de HCP en las pruebas de cribado primario con Capto Adhere, por lo que se quería investigar más a fondo el uso de la arginina en este modo de cromatografía. La urea del caótropro demostró una eliminación moderada de HCP en las pruebas de cribado primario de MBAP, por lo que se probó la urea en combinación y en serie con cloruro de sodio.

El etilenglicol al 10% también mostró una pequeña reducción en HCP, por lo que también se probó en combinación con NaCl para intentar aumentar la separación entre HCP y recAP o HCP y la matriz de columna. Finalmente, los reguladores de lavado se probaron a pH 7,0 y 8,0 para detectar interacciones dependientes del pH.

5 Además de probar el efecto de las etapas de lavado intermedio sobre la eliminación de HCP, se probó el efecto de eliminar NaCl en el regulador de elución. En el experimento de cribado primario, se observó que el NaCl 100 mM causó aproximadamente el 60% de avance del producto durante el lavado intermedio, y el NaCl 200 mM había provocado un avance completo del producto, sin la presencia de fosfato. Se teorizó que a una fuerza iónica alta, los mecanismos electrostáticos dominaban la cinética de unión y causaban que el ligando liberara proteínas en la fase móvil. La selectividad de la resina podría mejorarse mediante elución con una baja concentración de fosfato y sin NaCl, favoreciendo solo la disociación de recAP y el grupo fosfonato del ligando, y dejando las HCP unidas electrostáticamente a la resina hasta el despojo con NaCl 1M + fosfato 0,5M.

15 Se preparó un nuevo lote de material de carga después de la duodécima prueba de MBAP. La investigación concurrente del método de purificación con Capto Adhere indicó que una etapa de lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-arginina 0,2 M, pH 8,0 redujo la HCP en el eluato de Capto en un 50%. Por lo tanto, el nuevo lote de material de carga para los ensayos de selección secundaria de MBAP se preparó con la inclusión de la etapa de lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 en la etapa de purificación con Capto Adhere. El método de purificación con Poros HQ 50 se mantuvo sin cambios.

20 Se presenta un resumen de los resultados de las pruebas de cribado secundario en la Figura 11. En la Prueba 10, la única desviación del método de referencia fue la exclusión de NaCl en el regulador de elución; el material de carga y el lavado posterior a la carga con regulador de EQ fueron equivalentes. Este cambio en la formulación del regulador de elución solo redujo la concentración de HCP del eluato de MBAP en aproximadamente un 40% en comparación con la prueba de referencia. Por lo tanto, el resto de las pruebas usaron el regulador de elución sin NaCl. Las pruebas 14 a 20 se realizaron con un nuevo lote de carga de MBAP que se produjo a partir de un eluato de Capto Adhere que incorporaba un lavado de eliminación de HCP intermedio que contenía NaCl 0,1 M, L-arginina 0,2 M, pH 8,0. La prueba 14 mostró que la reducción de HCP lograda en la etapa con Capto combinado con la eliminación de NaCl en el regulador de elución de MBAP redujo el nivel de HCP del eluato MBAP a 667 ppm, sin la inclusión de un regulador de lavado que contiene moduladores en el método de purificación de MBAP. Varias pruebas redujeron la concentración de HCP a menos de 500 ppm, pero no generaron un rendimiento de producto aceptable. La combinación de lavado con etilenglicol al 10% y NaCl, pH 8,0 fue la única formulación de lavado intermedio que mejoró la eliminación de HCP (128 ppm) sin afectar gravemente el rendimiento (77%). Aunque este lavado fue efectivo para la eliminación de HCP, la inclusión de NaCl en el regulador de lavado intermedio se consideró un riesgo inaceptable, ya que muchas de las pruebas que utilizaban NaCl en los reguladores de lavado habían mostrado grandes pérdidas de producto recAP.

35 El análisis de transferencia Western de las fracciones de la Prueba 10, que utilizaban la formulación de regulador de elución MBAP sin NaCl, llevó a la conclusión de que la reducción en la concentración de HCP del eluato era probable debida a que la HCP permanecía unida a la resina durante la etapa de elución con fosfato (sin NaCl), mientras que el regulador de elución previo que contenía NaCl 130 mM coeluyó HCP con la recAP. Los resultados de ELISA de HCP mostraron que la concentración de HCP residual de la banda de la Prueba 10 es elevada en comparación con el eluato (Figura 12A). Los resultados de ELISA fueron confirmados por transferencia Western (Figura 12B). Se observó una banda de catA a aproximadamente 50 kDa en la carga (Carril 2), el eluato de la Prueba 1 (Carril 3) y la banda de la Prueba 10 (Carril 6). La banda de catA está ausente en el eluato de la Prueba 10 (Carril 5), lo que indica que la HCP catA se ha reducido por debajo del límite de detección (estimado como < 1.000 ppm) del ensayo en esta muestra. La misma banda fue más pronunciada en la muestra pico de la banda de la Prueba 10.

40 La Prueba 12, que incorporó 20, 40, 60 y 80 mM en las etapas de lavado con L-arginina, mostró la mayor reducción en HCP. La concentración de HCP del eluato era < 40 ppm pero el rendimiento era pobre con 37%. En esta prueba, las etapas de arginina se recogieron por separado para determinar la concentración de arginina a la que el recAP se disoció de la resina. Los análisis de las fracciones de lavado por transferencia Western (Figura 12B) mostraron que la impureza de HCP catA estaba presente en todos los lavados con arginina, mientras que no ocurría una pérdida significativa de producto hasta las etapas de arginina 60 y 80 mM. Este descubrimiento indicó que una etapa de lavado con arginina 40 mM puede ser capaz de eliminar selectivamente una cantidad significativa de HCP de la recAP y/o la resina sin interferir con la interacción de unión a recAP:ligando. Se eligió un lavado con arginina 40 mM para una investigación adicional en la tercera ronda de experimentos de cribado de lavado intermedio con MBAP.

Refinamiento de la etapa de lavado intermedio con MBAP

60 Se eligieron tres moduladores de lavado intermedio de los experimentos previos para un refinamiento adicional. En el estudio de cribado de lavado primario, la urea 1 M demostró la reducción de HCP en el eluato sin afectar la recuperación del producto. En el estudio de cribado secundario, el etilenglicol + NaCl redujo la HCP sin causar una pérdida severa del producto. La arginina mostró una eliminación selectiva de HCP, pero las concentraciones superiores a 40 mM afectaron negativamente el rendimiento. La siguiente fase del estudio se amplió a la investigación de estos moduladores. El uso de regulador de elución sin NaCl también se llevó a cabo. Las pruebas finales probaron los tres

candidatos principales con una carga de columna de resina de 3 g de recAP/L para evaluar la reducción en la capacidad de la columna debido al lavado del modulador.

5 Las formulaciones de reguladores de lavado de prueba específicos y el resumen de los resultados de las pruebas de refinamiento se presentan en la Figura 13. El lavado con urea 1 M no se había probado previamente en combinación con el regulador de elución solo de fosfato. Las Pruebas 21 y 22 utilizaron reguladores de lavado con urea 1 M y 2 M, respectivamente, y se eluyeron con el nuevo regulador de fosfato solamente. La Prueba 27 se realizó también con un lavado con urea 1 M, pero la cantidad de recAP cargada en la columna se aumentó hasta la densidad de carga objetivo de 3 g de recAP/L de resina. La Prueba 21 mostró que la carga de la columna con 1,8 g de recAP/L de resina combinada con el regulador de lavado de urea 1 M produjo un eluato con 59 ppm de HCP y 83% de recuperación de recAP. El aumento de la concentración de urea en el regulador de lavado o la densidad de carga de recAP condujo a una concentración de HCP residual más alta en el eluato del producto (299 y 371 ppm de HCP, respectivamente).

15 Los reguladores de lavado intermedios que combinaban urea 1 M con etilenglicol al 10% o arginina 40 mM también se evaluaron para la eliminación de HCP y el rendimiento del producto. El lavado de combinación con etilenglicol al 10%/urea 1 M generó un producto con una alta concentración de HCP residual (777 ppm). La combinación de lavado con arginina 40 mM/urea 1 M se realizó con cargas de columna de 2,3 y 3,0 g de recAP/L de resina. A la carga de producto más baja, el lavado con arginina/urea produjo un eluato con baja concentración residual de HCP, 46 ppm. El rendimiento del producto recAP resultante del 71% estaba por debajo de la recuperación deseada. Cuando se realizó la misma purificación a la mayor densidad de carga de recAP, la eliminación de HCP todavía era aceptable (68 ppm) pero la recuperación se redujo aún más al 66%.

25 Las pruebas 23 y 29 se realizaron usando arginina 40 mM, pH 8,0 en la etapa de lavado. La columna se cargó con 1,8 y 3 g de recAP/L de resina para las Pruebas 23 y 29, respectivamente. Ambas pruebas produjeron eluatos con una baja concentración residual de HCP (54 y 59 ppm) y lograron rendimientos aceptables (83 y 88%). Este lavado intermedio fue el único candidato que mantuvo la capacidad de eliminación de HCP y el alto rendimiento del producto a la máxima capacidad de carga de la columna.

30 El estudio de cribado para la etapa de columna Mimetic Blue AP identificó dos cambios de proceso que condujeron a la reducción de la concentración de HCP residual en la reunión del producto hasta aproximadamente 60 ppm. La primera mejora del proceso fue la adición de una etapa de lavado intermedio al método de cromatografía para la eliminación selectiva de HCP. El lavado seleccionado para la eliminación de la impureza proteica de tipo catepsina fue Tris 20 mM, L-Arg 40 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 8,0. La inclusión de 3,0 CV de este regulador de lavado intermedio seleccionado añadirá de 20 a 30 minutos al tiempo de proceso de MBAP. La segunda mejora del proceso fue la eliminación de NaCl del regulador de elución. La combinación de estas revisiones de proceso dio como resultado una reducción mayor a 30 veces en HCP residual medido por ELISA de HCP. Las condiciones refinadas de MBAP se integraron en un proceso a pequeña escala para confirmar estos hallazgos.

40 Prueba de confirmación de proceso

Después de que se concluyeron los experimentos de reducción de HCP, se completó una prueba de confirmación a pequeña escala incorporando las condiciones de proceso revisadas. La cosecha de cultivos celulares (200L PD 16OCT2012) se procesó a través de todas las operaciones de la unidad con la excepción de la filtración viral. El análisis del producto final se realizó en retentado de UF/DF filtrado. Se realizó un ciclo de cada etapa de cromatografía. Los intermedios del proceso se analizaron por RP-HPLC (para título y % de isómero A), ELISA (actividad y HCP) y SDS-PAGE y transferencia Western. Un resumen de los resultados analíticos se puede ver en la Figura 15. El nuevo proceso recuperó 53 mg de recAP purificado con un rendimiento del proceso global del 34%.

50 Cromatografía de captura con Capto Adhere

La prueba # 32 con Capto Adhere de los experimentos de reducción de HCP se realizó usando lavado intermedio con NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, a pH 8,0 (véase la Sección VI.C). Esta formulación de lavado mostró la mayor eliminación de HCP, y se eligió para su inclusión en el método de Capto Adhere. Por lo tanto, el eluato de la Prueba # 32 se purificó durante el resto del proceso de purificación.

55 Se procesó un total de 297 mL de la cosecha de cultivo celular 200L PD 16OCT2012 en la prueba # 32 con Capto Adhere. El título de la cosecha fue de 0,63 g/L de recAP mediante RP-HPLC. El factor de carga real fue de 7,8 g de recAP/L de resina. Durante la elución, se recogieron 187 mg de producto. El cromatograma mostró un perfil de pico de elución diferente del que se había observado antes de que se instituyera la nueva etapa de lavado. En este prueba, el pico de elución de UV280 se dividió, mientras que en las pruebas previas el eluato se desprendió en un solo pico (2). El motivo de este cambio en la forma del pico no está determinado, pero es muy probable que se deba a la etapa de lavado adicional con arginina. Aunque el cromatograma parecía diferente, el rendimiento general de recAP (93%) y el rendimiento de la actividad (86%) fueron equivalentes a las pruebas de demostración anteriores. El eluato se filtró a través de un filtro de PES de 0,2 µm y se almacenó a 2-8°C.

65 Inactivación Viral y Purificación con Poros 50 HQ

El eluato de Capto Adhere se equilibró a temperatura ambiente. Para alcanzar una concentración de Triton X-100 al 1,0%, se añadieron 4,65 mL de Triton X-100 al 10% (en WFI) a los 41,9 mL de eluato de Capto Adhere. El eluato se mezcló completamente y luego se incubó en forma estática durante 60 minutos para la inactivación viral completa. Después de la incubación, el material se diluyó 12X con 514 mL de WFI. El objetivo de conductividad fue $\leq 4,5$ mS/cm; la conductividad final de la solución fue de 4,13 mS/cm y el pH fue de 7,74.

La resina Poros HQ 50 se empaquetó en una columna de 1,1 cm a una altura de lecho de 19,6 cm para un volumen de columna final de 18,6 mL. La asimetría de columna fue 1,16 y la altura de la placa fue de 0,025 cm. El factor de carga real de esta prueba fue de 9,1 g de recAP/L de resina. El método de cromatografía no se modificó a partir de los parámetros de operación de la Prueba 5 de demostración (2). Se recogieron 56 mL de eluato. El análisis mostró un 61% de rendimiento de masa de recAP y un 66% de recuperación en la actividad. El eluato se filtró a través de un filtro de PES de 0,2 μ m y se almacenó a 2-8°C. La cromatografía por Poros HQ 50 se realizó como se esperaba.

15 Purificación de AP por Mimetic Blue

La etapa de cromatografía de AP por Mimetic Blue incorporó dos mejoras del método. Se añadió un regulador de lavado intermedio de 3,0 CV que contenía arginina 40 mM. Además, el regulador de elución se alteró eliminando el NaCl en el regulador. Ambas revisiones se implementaron para reducir la HCP en el proceso intermedio.

La resina Mimetic Blue AP (MBAP) se empaquetó en una columna de 2,2 cm a una altura de lecho de 16,0 cm para un volumen de columna final de 60,8 mL. La columna no se probó para HETP y la asimetría. La columna empaquetada se esterilizó con NaOH 0,5M y se equilibró con Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μ M, pH 8,0. El factor de carga real de esta prueba fue 1,6 g de recAP/L de resina. El eluato de Poros se diluyó 1:1 con WFI para reducir la conductividad de la unión. El volumen del eluato fue de 41 mL. El análisis mostró un 84% de rendimiento de masa de recAP y un 80% de recuperación en la actividad, que fue ligeramente inferior a las recuperaciones observadas en la Prueba 5 de demostración (2). La concentración de HCP del eluato de MBAP fue 34 ppm, que fue una reducción de 2500 veces del material de carga. El eluato se filtró a través de un filtro de PES de 0,2 μ m y se almacenó a 2-8°C.

30 Purificación con Butyl 650M

La siguiente etapa en el proceso incluyó una etapa de pulido usando cromatografía de interacción hidrófoba. La resina Butyl 650M se empaquetó en una columna de 1,1 cm a una altura de lecho de 8,7 cm para un volumen de columna final de 8,3 mL. La altura de lecho objetivo para la etapa de purificación con Butyl es de 19,5 cm, pero la altura se redujo en esta prueba para cargar la resina cerca de su capacidad. La asimetría de la columna fue de 1,17 y la altura de la placa fue de 0,034 cm. El eluato de MBAP después del muestreo fue de 37,8 mL. El eluato de MBAP se ajustó a AmSO₄ 1,0 M con la adición de 31,9 g de AmSO₄ 2,1 M. La conductividad de la carga fue de 135 mS/cm y el pH fue de 7,67. El factor de carga real en esta prueba fue de 9,2 g de recAP/L de resina. El método de cromatografía no se modificó a partir de los parámetros de operación de la Prueba 5 de demostración (2). Se recogió un volumen de eluato de 48 mL. Para la prevención de la formación de precipitado el eluato se diluyó inmediatamente con 96 mL de WFI para reducir la concentración de AmSO₄ hasta un volumen final diluido de 144,5 mL. El análisis mostró 86% de rendimiento de masa de recAP y 81% de recuperación en la actividad. El eluato se filtró a través de un filtro de PES de 0,2 μ m y se almacenó a 2-8°C. La cromatografía con Butyl 650M se realizó como se esperaba.

45 Ultrafiltración/Diafiltración

Se utilizó un cartucho de ultrafiltración PES de 10 kDa Pellicon (Millipore) de 50 cm² para la etapa UF/DF, proporcionando una relación de masa a área de 13 g/m². El cartucho se enjuagó con WFI y luego se equilibró con regulador de formulación (histidina 20 mM, D-sorbitol 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 μ M, pH 7,0). Los 145 mL de eluato de butilo diluido se concentraron aproximadamente 3 veces hasta 40 mL. Debido al pequeño volumen del producto, el producto retenido no se concentró aún más. Durante la concentración, el TMP a través de la membrana se mantuvo a ≤ 15 psi. Después de la concentración, el producto se diafiltró 10X con regulador de formulación. El material se recogió y se filtró a través de un filtro superior de botella de PES de 0,2 μ m. Después de la recuperación del producto, se recircularon 30 mL de regulador de formulación a través del cartucho para recuperar el producto de la superficie de la membrana. La descarga del regulador no se añadió al retenido, sino que se almacenó por separado. Esto se hizo para evitar la dilución del retenido de UF/DF. El rendimiento de la etapa UF/DF fue 67% de rendimiento de masa de recAP en el producto retenido y 15% en el lavado de regulador, lo que equivale a 82% de recuperación total de recAP. La concentración de HCP estaba por debajo del LOQ de 2 ppm. El producto se almacenó a 2-8°C.

60 Resumen de la prueba de confirmación de reducción de HCP

El objetivo de esta prueba de purificación fue realizar todo el proceso de purificación desde la etapa de captura hasta UF/DF y la formulación final, incorporando los cambios de proceso realizados en las etapas de cromatografía con Capto Adhere y Mimetic Blue AP. Se trató de demostrar que estos cambios podrían reducir la concentración de HCP en la BDS muy por debajo de la especificación objetivo de ≤ 100 ppm sin afectar adversamente la actividad de la molécula de recAP o el rendimiento del proceso en general. El análisis de transferencia Western de los intermedios del proceso

mostró que catA era indetectable después de la etapa de lavado intermedio de Mimetic Blue (Figura 14). La concentración residual de HCP en la BDS producido en esta prueba, de acuerdo con lo determinado por ELISA de HCP, fue <2 ppm (por debajo del LOQ). La actividad específica a 543 U/mg estuvo dentro de las especificaciones, y el rendimiento global fue del 34%. La recuperación del producto en la etapa de UF/DF fue menor que en las pruebas 4 y 5 Demo, pero se sabe que el bajo volumen de producto retenido en UF/DF causa una recuperación deficiente del producto. Además de la etapa de UF/DF, los rendimientos de la etapa fueron equivalentes a las pruebas 4 y 5 Demo, lo que demuestra que los cambios en el proceso con Capto Adhere y MBAP no redujeron significativamente el rendimiento total del proceso.

10 Ejemplo 4

Proceso de purificación

El proceso de purificación para recAP incluye seis operaciones unitarias. La etapa de captura por cromatografía de Capto Adhere es seguida por la inactivación viral del eluato con Triton X-100 al 1%. La cromatografía de intercambio aniónico por Poros HQ 50 elimina el detergente y purifica parcialmente la corriente de alimentación. Se realizan dos etapas adicionales de cromatografía (Mimetic Blue AP y Butyl 650M) para reducir las impurezas (es decir, proteína de la célula huésped, ADN) de acuerdo con las especificaciones. El material se concentra y se intercambia el regulador en el regulador de formulación utilizando una membrana de PES MWCO de 10 kDa. Finalmente, la recAP purificada se filtra por virus usando un filtro de fibra hueca Planova 15N.

20 Cromatografía de captura de Capto Adhere

El objetivo de la etapa de captura es separar la molécula objetivo del medio de cultivo celular, concentrar el producto y purificar parcialmente la recAP. La resina de modo mixto Capto Adhere fue elegida como la etapa de captura en el proceso de purificación. La capacidad de la columna Capto Adhere se había determinado previamente como 8 g de recAP/L de resina (3).

Las cosechas de cultivos celulares clarificadas 14OCT2012 B01 y B03 se combinaron para proporcionar aproximadamente 20 L de cosecha para el proceso de recuperación y purificación. La resina Capto Adhere se empaquetó en una columna BPG 100 esterilizada (GE Healthcare) hasta una altura de lecho de 23,7 cm para un volumen final de columna de 1,9 L. La asimetría de columna fue 1,44 y la altura de la placa fue de 0,049 cm. La columna empaquetada se esterilizó en NaOH 0,5 M y se equilibró. El título de la cosecha combinada fue 0,7 g/L de recAP por RP-HPLC, por lo que se procesaron los 20 litros de cosecha. El factor de carga real fue de 7,3 g/L de resina. Después de cargar la cosecha en la columna, se realizó una etapa de lavado con sal NaCl, seguido de lavado con regulador EQ para reducir la concentración de NaCl. La elución se logró con L-arginina 0,55 M + NaCl 0,1 M. Durante la fase de elución del método, la dirección del flujo se invirtió para minimizar el volumen del eluato. La recolección de picos de eluato se inició cuando el UV280 se elevó a 1,75 AU/cm. Se recogieron dos CV de eluato a través de un filtro de PES de 0,2 µm en un BPC estéril de 50 L; el volumen del eluato fue de 3,9 L. La conductividad fue de 38,2 mS/cm y el pH fue de 7,79. El BPC de gran volumen se eligió para permitir la dilución con agua 13X que se realiza en la siguiente etapa de cromatografía. La prueba se realizó de manera equivalente a las pruebas de demostración anteriores.

40 Inactivación Viral y Purificación con Poros 50 HQ

El eluato de Capto Adhere se equilibró a temperatura ambiente. Se añadieron 533 mL de Triton X-100 al 10% (en WFI) al eluato dando como resultado una concentración final de 1,2%. (El objetivo de la concentración del 1.0% se excedió debido a un error de medición del peso). El eluato se mezcló completamente y luego se incubó en forma estática durante 60 minutos. Después de la incubación, el material se diluyó 13X con 63,9 L de WFI. El objetivo de conductividad fue ≤ 4,5 mS/cm; la conductividad final de la solución fue de 3,21 mS/cm y el pH fue de 7,72.

La resina Poros HQ 50 se empaquetó en una columna BPG 100 esterilizada (GE Healthcare) a una altura de lecho de 20,0 cm para un volumen de columna final de 1,6 L. La asimetría de columna fue de 1,63 y la altura de la placa fue de 0,020 cm. Los parámetros de purificación para la etapa con Poros HQ 50 se enumeran en 10 a continuación. La columna empaquetada se esterilizó en NaOH 0,5 M y se equilibró. La capacidad de la columna Poros HQ 50 se había determinado previamente como 10 g de recAP/L de resina (3). El factor de carga real de esta prueba fue 8,0 g de recAP/L de resina. Después de cargar la columna, se realizó una etapa de lavado con sal NaCl 50 mM para eliminar las impurezas. La elución se realizó en flujo descendente con NaCl 130 mM. La recolección máxima del eluato se inició cuando el UV280 se elevó a 0,5 AU/cm. Se recogieron tres CV de producto eluido a través de un filtro de PES de 0,2 µm en un BPC estéril de 10 L; el volumen fue 4,7 L. La conductividad del eluato fue de 14,6 mS/cm y el pH fue de 8,22.

La prueba se realizó de manera equivalente a las pruebas de demostración anteriores, excepto que el rendimiento de recAP (61%) fue menor que en la prueba 4 de demostración (85%). La razón del rendimiento reducido es desconocida. La conductividad del regulador de elución se verificó para determinar si la formulación de regulador incorrecta era la causa del menor rendimiento. El regulador era de 14 mS/cm, que es la conductividad objetivo para el regulador, por lo que se eliminó la baja concentración de NaCl como causa. La conductividad del regulador de lavado también estaba dentro de las especificaciones, lo que sugiere que el bajo rendimiento no se debió a la pérdida de producto en el regulador de lavado. El eluato de Poros HQ 50 se analizó mediante RP-HPLC (título y % de isodímero A), ensayos de

SEC-HPLC (pureza) y ELISA (actividad y HCP). El análisis mostró un 61% de rendimiento de masa de recAP y un 60% de recuperación en la actividad. Comparando el eluato de Poros con el material de carga, el porcentaje de isodímero A aumentó de 82% a 93% y la pureza por SEC aumentó de 36% a 87%. HCP se redujo tres veces. El eluato se almacenó a 2-8°C.

5

Purificación con Mimetic Blue AP

10

La resina Mimetic Blue AP (MBAP) se empaquetó en una columna esterilizada Quickscale de 14 cm de diámetro (Millipore) a una altura de lecho de 17,0 cm para un volumen de columna final de 2,6 L. La asimetría de la columna fue de 1,37 y la altura de la placa fue de 0,039 cm. La columna empaquetada se esterilizó en NaOH 0,5 M y se equilibró. La capacidad de la columna MBAP se había determinado previamente como 3 g de recAP/L de resina (3). El factor de carga real de esta prueba fue 2,9 g de recAP/L de resina. El eluato de Poros se diluyó 1:1 con WFI para reducir la conductividad. Después de cargar el eluato de Poros diluido en la columna, el material no unido se eliminó con un lavado con regulador EQ. La elución se realizó en flujo descendente con NaPO₄ 25 mM, NaCl 130 mM. El eluato se recogió cuando UV280 se elevó por encima de 0,125 AU/cm hasta que cayó a 0,25 AU/cm en el extremo de la cola del pico. El eluato se recogió a través de un filtro de PES de 0,2 µm en un BPC estéril de 10 L; el volumen fue de 2,4 L, o 0,9 CV.

15

20

La prueba se realizó de manera equivalente a las pruebas de demostración anteriores. El eluato se analizó mediante UV280 (título), RP-HPLC (% de isodímero A), SEC-HPLC (pureza) y ELISA (actividad y HCP). El análisis mostró un 92% de rendimiento de masa de recAP y un 96% de recuperación en la actividad. La pureza del producto por SEC aumentó de 87% a 99.6%. La HCP se redujo aproximadamente 50 veces. El eluato se almacenó a 2-8°C.

25

Purificación con Butyl 650M

30

Se empaquetó la resina Butyl 650M en una columna BPG 100 esterilizada (GE Healthcare) a una altura de lecho de 19,0 cm para un volumen de columna final de 1,5 L. La asimetría de la columna fue de 1,37 y la altura de la placa fue de 0,039 cm. La columna empaquetada se esterilizó en NaOH 0,5 M y se equilibró con AmSO₄ 1,0M. El eluato de 2,4 L de MBAP se ajustó con AmSO₄ 1,0 M con la adición de 2,2 L de 2,1 M de AmSO₄. La conductividad de la carga fue de 125,7 mS/cm y el pH fue de 7,77. La capacidad de la columna de Butyl 650M se había establecido previamente como 10 g de recAP/L de resina (4), aunque la verdadera capacidad de la columna en las condiciones de procesamiento actuales no se ha estudiado rigurosamente. La carga real en esta prueba fue de 4,6 g de recAP/L de resina, aproximadamente la mitad del factor de carga objetivo. Después de cargar la columna, el material no unido se eliminó con un lavado con regulador EQ. La elución se logró con AmSO₄ 0,6 M. El pico del eluato se recogió entre 0,25 AU/cm hasta que el UV cayó a 0,25 AU/cm en la cola del pico. El eluato se recogió a través de un filtro de PES de 0,2 µm en un BPC de 20L; el volumen fue 4,4 L. Para la prevención de la formación de precipitado, el eluato se diluyó inmediatamente con 8,8 L de WFI para reducir la concentración de AmSO₄. La prueba se realizó de manera equivalente a las pruebas de demostración anteriores.

40

Ultrafiltración/Diafiltración

45

En la Prueba 5 de demostración, se usó un nuevo regulador de formulación con el fin de mejorar la solubilidad de la materia propensa a la formación de partículas. La nueva formulación fue histidina 20 mM, D-sorbitol 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 7,0. La adición posterior de VF de glicerol al 25% se eliminó del proceso, por lo que el objetivo de concentración final de UF/DF se cambió de ≥13,5 g/L a ≥11,5 g/L.

50

Para la Prueba 5 de demostración, se usó un cartucho de ultrafiltración PES de 10 kDa Pellicon XL Biomax (Millipore) de 0,1 m², que proporcionaba una relación de masa a área de 57 g/m². El cartucho se enjuagó con WFI y luego se equilibró con regulador de formulación. El eluato de HIC diluido se concentró a 15 g/L. Durante la concentración, el TMP a través de la membrana se mantuvo a 8-15 psi. Después de la concentración, el producto se diafiltró 10X con regulador de formulación. El material se recogió en una botella PETG de 1L. Después de la recuperación del producto, se recircularon 100 mL de regulador de formulación a través del cartucho para recuperar el producto de la superficie de la membrana. La descarga de regulador se añadió al retenido y la solución se filtró a través de un filtro superior de botella de PES de 0,2 µm. El volumen final fue de 460 mL. El producto se analizó mediante UV280 (título), RP-HPLC (% de isodímero A), SEC-HPLC (pureza) y ELISA (actividad y HCP). Los resultados analíticos se muestran en la Tabla 6: Resultados analíticos de la 5 de demostración de UF/DF. El rendimiento de la etapa de UF/DF fue 105% de rendimiento de masa de recAP y 85% de recuperación en la actividad. La concentración de HCP fue de 120 ppm, que fue mayor que el objetivo de 100 ppm. El eluato se almacenó a 2-8°C.

60

Tabla 6. Resultados analíticos de la UF/DF de la prueba 5 de demostración

ID	Vol (L)	Conc. de recAP (g/L)	Masa total de recAP (g)	Isodímero A (%)	Actividad específica U/mg	Pureza total de recAP (%)	HCP ng/mL	HCP (ppm)
Método de ensayo		UV	UV	RP-HPLC	Actividad RP-HPLC	SEC-HPLC	ELISA	ELISA RP-

								HPLC
Eluato de HIC diluido 3x	13,3	0,43	5,7	89,3	691	100		
Retenido de UF/DF	0,5	13,0	6,0	90,1	562	100	1,560	120
Rendimiento recAP (% recuperado)	105							
Rendimiento actividad (% recuperado)	85							

Filtración viral y relleno a granel

5 Se usó un filtro viral de fibra hueca Planova 15N de 0,01 m² (Asahi) para la etapa de filtración viral. El cartucho se drenó de regulador de almacenamiento y se equilibró con regulador de formulación usando una bomba peristáltica. La velocidad de flujo se ajustó a 5 mL/min para lograr una presión de 15 psi a través de la membrana. El retenido de UF/DF se retiró del almacenamiento en frío para equilibrarse a temperatura ambiente. Se observó que se habían formado de 5 a 10 pequeñas partículas blancas en el retenido durante la noche. El producto retenido se bombeó a 5 mL/min a través del filtro y se recogió en una botella de PETG estéril. La filtración se completó en 180 minutos y la presión se mantuvo en 15 psi durante el proceso. Se bombearon diez mL de regulador de formulación a través del cartucho, se recogieron y se agregaron al producto para maximizar la recuperación. La concentración se ajustó a 9,9 g/L con la adición de 96 mL de regulador de formulación. El volumen final de filtrado viral fue de 490 mL, produciendo 4,8 g de producto. Se tomaron muestras para su análisis mediante UV280 (título), RP-HPLC (% de isodímero A), SEC-HPLC (pureza) y ELISA (actividad y HCP). El rendimiento de la etapa para la FV fue 95% de rendimiento de masa de recAP y 94% de recuperación en la actividad en comparación con el retenido de UF/DF.

20 La etapa final en el proceso fue la filtración del producto de VF mediante un filtro superior de botella de PES de 0,2 µm. El BDS final fue transparente y libre de partículas inmediatamente después de la filtración. Análisis de BDS (Tabla 7) mostró 97% de rendimiento de masa de recAP y 98% de recuperación en actividad en comparación con el filtrado viral. La concentración de HCP se mantuvo sin cambios a 123 ppm, que fue mayor que el objetivo de 100 ppm. La BDS se almacenó a 2-8°C.

Tabla 7: Resultados analíticos de VF y formulación

ID	Vol (L)	Conc. recAP (g/L)	Masa total de recAP (g)	Isodímero A (%)	Actividad específica a U/mg	Pureza Total de recAP (%)	HCP ng/mL	HCP (ppm)	Rendimiento de recAP (%)	Rendimiento de actividad (%)
Método de ensayo		UV ₂₈₀	UV ₂₈₀	RP-HPLC	Actividad RP-HPLC	SEC-HPLC	ELISA	ELISA RP-HPLC	UV ₂₈₀	ELISA
Retenido de UF/DF	0,40	13,0	6,0	90,1	562	100,0	1.560	120		
Filtrado viral	0,49	10,1	4,9	90,1	554	100,0	1.244	123	95	94
SDS	0,49	9,9	4,8	90,0	559	100,0	1.221	123	97	98

25 Resumen de la prueba 5 de demostración

En la Tabla 8 se presenta un resumen del análisis de las etapas del proceso intermedio del proceso 5 de demostración y la BDS final.

30 Tabla 8. Rendimientos de recAP y actividad para cada etapa así como los rendimientos acumulados del proceso

ID	Vol (L)	Pruebas relacionadas con el producto							Pruebas de impurezas			Rendimiento		
		?	?	?	?	?	Actividad U/mL	Actividad Total [U]	?	HCP ppm	Pureza total de recAP (%)	?	Rendimiento de recAP (%)	Rendimiento de actividad (%)
Método de ensayo		UV ₂₈₀	UV ₂₈₀	RP-HPLC	RP-HPLC	RP-HPLC			?	ELISA-RP-HPLC	?	qPCR		
Recolección B01 + B03	19,4		NA	0,7	13,8	81,3	368	7.139.200	518	1.042.215	3,8			

Eluato de Capto Adhere	3,8		NA	3,3	12,5	82,3	1990	7.582.000	603	487.457	35,5	91	105	
Eluato de Poros	4,6		NA	1,7	7,5	93,3	982	4.517.200	595	166.419	87,2	91	60	
Eluato de Mimetic Blue	2,4	2,8	6,9			90,2	1.776	4.333.440	630	3.191	99,6	91	95	
Eluato de HIC diluido 3X	13,3	0,4	5,7			89,3	297	3.950.100	691	ND	100,0	8,0	93	91
Retentado UF/DF	0,48	13,0	6,0			90,1	7.322	3.368.120	562	120	100,0	0,3	105	85
Filtrado viral	0,49	10,1	4,9			90,1	5.500	2.744.000	554	123	100,0		95	94
BDS	0,49	9,9	4,8			90,0	5.530	2.687.580	559	123	100,0	0,3	97	98

El rendimiento en masa del proceso acumulativo total de escalamiento de la prueba 5 de demostración fue 40% y el rendimiento de actividad fue 43% (Tabla 9). Este rendimiento es ligeramente inferior al rendimiento esperado del 45-50%. Se cumplieron las especificaciones de concentración, actividad, pureza y ADN residual. La concentración de HCP en la BDS fue de 123 ppm, que fue mayor que el objetivo de 100 ppm.

Tabla 9: Especificaciones del producto y resultados para la Prueba 5 de demostración. Todos los parámetros que se probaron cumplieron con las especificaciones excepto HCP.

Prueba	Método	Especificación	Resultados de la prueba 5 de demostración
Concentración	A280	9,0 – 11,0 mg/mL	9,9 mg/mL
Actividad Específica	Ensayo de actividad	500 - 600 U/mg	559 U/mg
Pureza	SEC-HPLC	≥ 98% del pico principal	100%
	Proteína residual de la célula huésped	≤ 100 ppm	123 ppm
	ADN Residual	≤ 35 pg/mg	0,3 pg/mg
	Carga biológica	≤ 1 ufc/mL	No determinado
	Endotoxina	≤ 0,5 EU/mg de proteína	No determinado

10 Ejemplo 5

Resultados y discusión de la prueba de demostración

15 Descripción del proceso

15

Los parámetros para todo el proceso se desarrollaron inicialmente durante una serie de purificaciones a pequeña escala usando diversas cosechas de cultivo celular más adelante. Los parámetros de proceso para las etapas de cromatografía con Capto Adhere y Mimetic Blue se refinaron para aumentar el nivel de eliminación de proteína de la célula huésped después del descubrimiento de partículas, identificadas como una proteína de célula huésped tipo catepsina (más específicamente, como se confirmó con espectrometría de masas, como el homólogo de Catepsina A de hámster), en lotes de BDS de las pruebas de demostración anteriores. Una vez que se revisó el proceso de recuperación y purificación, se realizó una prueba de confirmación a pequeña escala para confirmar las condiciones finales del proceso (1). Los resultados de la prueba de demostración presentada en este informe utilizaron una cosecha de cultivo celular clarificada (producción de PD de 200 L) que fue representativa del proceso final más adelante (5). Para esta prueba de demostración, el equipo de desarrollo del proceso posterior proporcionó aproximadamente 70 litros de cosecha de cultivo celular clarificado con un título de fase reversa (RP) de aproximadamente 0,6 g/L de recAP. Una parte de ese material de cosecha, aproximadamente 24 litros, se utilizó para la prueba 6 de demostración.

20

25

30

Se purificaron aproximadamente 14 gramos de producto mediante cuatro etapas de cromatografía usando los tamaños de columna enumerados, cargas de columna, caudales, tiempos de permanencia y modos de elución (Tabla 10). Una vez que el producto se purificó por las cuatro etapas de cromatografía, se realizó ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para concentrar el producto así como eliminar el sulfato de amonio presente en el intermedio del proceso con Butyl 650M. El retenido de UF/DF se filtró entonces a través de un filtro viral Planova 15N. Finalmente, el producto se filtro por PES de 0,2 micras en un contenedor apropiado para lograr la sustancia farmacéutica a granel. Se debe tener en cuenta que

esta prueba de demostración incorporó el uso del coeficiente de extinción de recAP medido de 1,01 mL/mg *cm para todos los cálculos de concentración basados en UV280.

Tabla 10: Resumen de las condiciones cromatográficas de la columna de la prueba 6 de demostración

Condiciones cromatográficas de la prueba 6 de demostración									
Resina	Etapas del proceso	Tamaño de columna	Material de carga	Preparación de la carga	Tiempo de permanencia de la carga (min)	Carga (g recAP/L de resina)	Velocidad de flujo (cm/h)	Dirección del Flujo de elución	Modo de elución
Capto Adhere	Captura	ID 10,0 cm x 23,7 cm columna BH = 1,86 L	Producción PD de 200L	Ninguna	5,7	7,5	250 excepto 150 durante la elución y 400 post elución	Hacia arriba	Unión y elución
Poros 50 HQ	Purificación 1	ID 10,0 cm x 19,5 cm columna BH = 1,53 L	Eluato de Capto	(1) Inactivado con 10% p/v de Triton X-100 (2) Diluido 12X (1 + 11) con WFI	5,3	9,0	400 excepto 300 durante el cargue y 250 para la elución	Hacia abajo	Unión y elución
Mimetic Blue AP	Purificación 2	ID 10,0 cm x 17,0 cm columna BH = 2,62 L	Eluato de Poros	Diluido 12X (1 + 11) con WFI	4,1	3,3	100 excepto 50 durante el almacenamiento en etanol	Hacia abajo	Unión y elución
Butyl 650M	Pulido	ID 10,0 cm x 18,8 cm columna BH = 1,48 L	Eluato de Mimetic Blue	Ajustado con AmSO ₄ 1,0 M	2,8	5,5	400 excepto 250 durante la elución	Hacia abajo	Unión y elución

5

Etapa de captura con Capto Adhere

Se utilizó una etapa de columna con Capto Adhere para capturar el producto recAP dentro de la cosecha clarificada y concentrar la corriente de alimentación. El acondicionamiento del material de carga de cosecha no fue necesario para la resina Capto Adhere ya que esta resina puede tolerar la corriente de alimentación con alta conductividad. El material de carga se equilibró a temperatura ambiente y se cargó en la columna Capto Adhere empaquetada de 1,86 L y se purificó usando las condiciones enumeradas en la Tabla 11. La cantidad máxima de producto cargado fue 14,0 g por lo que requiere solo un ciclo con 8 g de recAP/L de resina de carga para la columna Capto Adhere empaquetada. La elución del producto se produjo con un comando de observación inicial UV seguido de una recolección para 2,0 volúmenes de columna (CV). Después de la elución, el producto intermedio se filtró por 0,2 micras en un BPC de 100 litros (Hyclone) para acomodar la inactivación viral y a continuación una dilución de 12 veces. Una vez recogido, el intermedio con Capto Adhere se movió inmediatamente a la etapa de inactivación viral y dilución.

10

15

Tabla 11. Condiciones de la prueba de cromatografía de captura con Capto Adhere

Capto Adhere ID 10,0 cm x 23,7 cm BH = 1,86 L					
Bloque	Condición del regulador	#CV	Velocidad de flujo (cm/h)	Dirección de flujo	Otros
Esterilización	NaOH 0,5 M	3,0	≤250	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Condición	NaCl 2 M	3,0	≤250	Hacia abajo	
Equilibrio	Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	3,0	≤250	Hacia abajo	
carga	Recolección eliminada	NA	≤250	Hacia abajo	
Lavado 1	Tris 20 mM, NaCl 0,25 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	7,5	≤250	Hacia abajo	
Lavado 2	Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	1,5	≤250	Hacia abajo	
Lavado 3	Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, L-	5,0	≤250	Hacia abajo	

	arginina HCl 0,2 M, glicerol al 5%, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0				
Lavado 4	Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	3,0	≤250	Hacia abajo	
Etapas de elución	Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, L-arginina 0,55 M, glicerol al 5%, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	4,0 o hasta el final de la recolección del eluato	≤150	Hacia arriba	Inicio de recolección con UV ₂₈₀ ≥ 1,75 AU/cm, final de la recolección después de 2,0 CV
Banda 1	Ácido acético 0,1 M, NaCl 2M	3,0	≤400	Hacia arriba	
Banda 2	WFI	3,0	≤400	Hacia arriba	
Saneamiento	NaOH 0,5 M	3,0	≤400	Hacia arriba	Sostenido 60 min
Enjuague	WFI	3,0	≤400	Hacia arriba	
Almacenamiento	Etanol al 20%	3,0	≤400	Hacia arriba	

La carga real sobre la columna Capto Adhere fue de 7,5 g de recAP/L de resina. Se empleó un lavado con alto contenido de sal (NaCl 250 mM) para eliminar las impurezas (es decir, ADN, HCP) unidas iónicamente a la resina de modo mixto. Después del lavado con alto contenido de sal, se completó un lavado de 1,5 CV con regulador de equilibrio para evitar la pérdida de producto debido a la mezcla potencial del regulador de lavado con alto contenido de sal y el lavado intermedio con sal, L-arginina y glicerol. El lavado intermedio (NaCl 0,1 M, L-arg 0,2 M, glicerol al 5%) se incorporó al proceso de recuperación y purificación refinado para aumentar la eliminación de la proteína de la célula huésped, específicamente la proteína similar a catepsina (catA), que se transporta a lo largo del proceso de recuperación y purificación de referencia. Para evitar la mezcla de los reguladores de lavado intermedio y de elución, se incluyó en el proceso un lavado de equilibrado de 3,0 CV. La elución del producto se logró en flujo ascendente usando una combinación de L-arginina y cloruro de sodio como se estableció durante el desarrollo preliminar. El volumen máximo de eluato fue de 2,0 CV una vez que se produjo la condición de vigilancia UV. La corriente de alimentación se redujo de 23,7 litros a aproximadamente 3,7 litros después de la etapa de la columna con Capto Adhere.

Los resultados sugirieron que la incorporación del lavado intermedio (Lavado No. 3) que posee una combinación de moduladores fue beneficiosa para mejorar el nivel de eliminación de HCP para la etapa de captura dentro del proceso de recuperación y purificación. En general, los resultados analíticos para el intermedio del proceso con Capto Adhere fueron muy comparables con las pruebas de demostración anteriores, pero con una eliminación significativamente mayor de HCP.

Inactivación Viral y Purificación con Poros 50 HQ

Se incluyó una etapa de inactivación viral para inactivar eficazmente posibles virus encapsulados. El detergente Triton X-100 utilizado para la inactivación debe eliminarse del producto antes del llenado del producto y la administración a humanos y animales, lo que se puede lograr mediante las etapas del proceso que siguen a la inactivación. La etapa de purificación a seguir para la inactivación viral incluyó cromatografía de intercambio aniónico usando resina Poros HQ. Esta etapa del proceso ayudará a eliminar el Triton X-100 residual, así como las impurezas adicionales (es decir, ADN, HCP) del producto. Aproximadamente 13,8 g de producto se recuperaron después de la etapa de captura con una conductividad de 38,8 mS/cm. La carga máxima para la resina Poros HQ no debe exceder 10 g de recAP/L de resina, por lo tanto, solo se requirió un ciclo para una columna Poros HQ de 1,53 litros.

La cromatografía con Capto Adhere y la inactivación viral se completaron el mismo día. Para la inactivación viral, se añadió una solución madre 1:9 v/v de Triton X-100 al 10% al eluato de Capto Adhere para obtener una concentración final de Triton X-100 al 1%. El producto se mezcló completamente y luego se mantuvo estático durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la inactivación viral completa. Antes de la carga en la columna Poros HQ empaquetada, el eluato de Capto inactivado viral se diluyó 12X (1 + 11) con WFI para reducir la conductividad a 4,4 mS/cm, que está dentro de la especificación de ≤ 4,5 mS/cm. El eluato viral de Capto Adhere inactivado y diluido se cargó en una columna Poros HQ de 1,53 L con una carga de aproximadamente 9 g de recAP/L de resina. El producto se purificó usando las condiciones establecidas enumeradas en la Tabla 12. Se realizó un lavado bajo en sal (NaCl 50 mM) para eliminar las impurezas después de cargar el material. La elución del producto se logró usando alta cantidad de sal (NaCl 130 mM) para una recolección máxima de eluato de 3,0 CV una vez que se produjo la condición de vigilancia con UV. El eluato se filtró a 0,2 micras en un BPC de 10 L (Hyclone) antes del almacenamiento a 2-8°C.

Tabla 12. Condiciones de la prueba de cromatografía con Poros HQ

Poros 50 HQ ID 10,0 cm x 19,5 cm BH = 1,53 L					
Bloque	Condición del regulador	#CV	Velocidad	Dirección	Otros

			de flujo (cm/h)	de flujo	
Esterilización	NaOH 0,5 M	3,0	≤400	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Condición	NaCl 2 M	3,0	≤400	Hacia abajo	
Equilibrio	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, pH 8,0	3,0	≤400	Hacia abajo	
carga	Inactividad viral y eluato diluido de Capto Adhere	NA	≤400	Hacia abajo	
Lavado post carga	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, NaCl 50 mM pH 8,0	5,0	≤400	Hacia abajo	
Etapas de elución	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, NaCl 130 mM, pH 8,0	4,0 o hasta el final de la recolección del eluato	≤250	Hacia abajo	Inicio de recolección a UV ₂₈₀ ≥ 0,5 AU/cm; final de la recolección después de 3,0 CV
Banda	NaCl 2M	3,0	≤400	Hacia abajo	
Esterilización	NaOH 0,5 M	3,0	≤400	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Almacenamiento	Etanol al 20%	3,0	≤400	Hacia abajo	

El perfil de cromatografía para la etapa con Poros HQ fue consistente con los resultados previos, dando una ligera absorbancia UV durante la carga debido a la presencia de Triton X-100 en el material de carga. El cromatograma reveló un pico agudo de eluato con una absorbancia máxima de 3,2 AU. Hubo un pico intenso durante la banda de NaCl 2M, que previamente se identificó como impurezas no relacionadas con el producto.

El eluato de Poros HQ se analizó mediante el método de valoración de RP-HPLC, ensayo de actividad de punto final, ELISA de HCP y SEC-HPLC y se comparó con el intermedio de Capto Adhere. Las recuperaciones de recAP y actividad para la etapa de purificación fueron similares a la prueba 5 de demostración así como a la prueba de confirmación de a escala de laboratorio con 63% y 68% respectivamente (1, 2). Hubo una reducción de más de 3 veces en HCP residual en comparación con el material de carga, sugiriendo que las primeras dos etapas del proceso eran capaces de una reducción significativa de HCP aunque las etapas de purificación adicionales eran necesarias para cumplir con la especificación de HCP objetivo de ≤ 100 ppm. El % de isómero A aumentó en el intermedio, manteniendo una alta pureza de recAP del 98,6% por SEC-HPLC.

Purificación con Mimetic Blue

Después de la finalización de la purificación con Poros 50 HQ, la etapa de purificación posterior incluyó la cromatografía de afinidad usando la resina Mimetic Blue AP. Había aproximadamente 9 g de producto para purificar mediante la etapa de columna con Mimetic Blue. Con una columna empaquetada de 2,6 L, solo se requirió un ciclo a una carga de aproximadamente 3,3 g de recAP/L. El eluato de Poros HQ se dejó calentar a temperatura ambiente seguido de una dilución 2X (1 + 1) con WFI para reducir la conductividad antes de la carga. Una vez que se diluyó la alícuota, se cargó en la columna empaquetada con Mimetic Blue de 2,6 L y se purificó usando las condiciones revisadas enumeradas en la Tabla 13. Las condiciones del proceso se modificaron ligeramente a partir de las condiciones previamente establecidas con la inclusión de un lavado intermedio con L-arginina para eliminar HCP residual seguido de un lavado con regulador de equilibrio para evitar la pérdida de producto debido a la mezcla de regulador. Además del lavado intermedio, las condiciones de elución se modificaron a partir de las pruebas de demostración previas con el uso de únicamente fosfato de sodio en lugar de una combinación de fosfato de sodio y sal. Los estudios de refinamiento para la etapa de columna con Mimetic Blue demostraron una disminución dramática en HCP residual para el proceso intermedio con la exclusión de sal en el regulador de elución, por lo que se eliminó del proceso (1). Durante la elución, se utilizó un rango UV predefinida de ≥0,125 AU/cm a ≤0,25 AU/cm para la recolección del producto. El producto se filtró mediante PES de 0,2 micras en un BPC estéril de 5 L (Hyclone) antes del almacenamiento a 2-8°C.

Tabla 13. Condiciones de la prueba de cromatografía de purificación con Mimetic Blue

Mimetic Blue AP ID 14,0 cm x 17,0 cm BH = 2,6 L					
Bloque	Condición del regulador	#CV	Velocidad de flujo (cm/h)	Dirección de flujo	Otros
Esterilización	NaOH 0,5 M	3	≤100	Hacia	Sostenido 60 min

				abajo	
Equilibrio	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	3	≤100	Hacia abajo	
carga	Carga del eluato diluido 2X (1+1) de Poros	NA	≤100	Hacia abajo	
Lavado #1	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	1,5	≤100	Hacia abajo	
Lavado #2	Tris 20 mM, L-arginina HCl 40 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	3			
Lavado #3	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	1,5			
Etapas de elución	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, fosfato de sodio 25 mM, pH 8,0	4,0 o hasta el final de la recolección del eluato	≤100	Hacia abajo	Inicio de recolección a UV ₂₈₀ ≥ 0,125 AU/cm; final de la recolección a UV ₂₈₀ ≤ 0,25 AU/cm
Banda	Fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M; pH 7,0	3	≤100	Hacia abajo	
Esterilización	NaOH 0,5 M	3	≤100	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Almacenamiento	Etanol al 20%	3	≤50	Hacia abajo	

El perfil de elución de cromatografía fue muy similar a las pruebas de demostración previas. El eluato fue analizado por el grupo analítico para el título de RP, qPCR para ADN residual, actividad enzimática, HCP residual y pureza por SEC-HPLC. Los resultados de la etapa de purificación con Mimetic Blue revelaron recuperaciones del 92% para recAP y del 91% para la actividad. La pureza por SEC-HPLC aumentó hasta aproximadamente 100%, confirmando que recAP era el producto principal presente en el intermedio. El nivel de ADN residual se redujo a <0,5 pg/mg, muy por debajo de la especificación objetivo de ≤ 35 pg/mg. De acuerdo con la prueba de confirmación a escala de laboratorio, la HCP residual presente en el eluato de Mimetic Blue disminuyó drásticamente aproximadamente 2000 veces utilizando las condiciones refinadas con Mimetic Blue, que fue una gran mejora con respecto a la reducción de 50 veces presentada en la prueba 5 de demostración (1, 2). La HCP residual estaba significativamente por debajo de la especificación objetivo de ≤100 ppm para la sustancia del fármaco. Los resultados de la purificación con Mimetic Blue establecieron que la etapa de la columna con Mimetic Blue proporcionaba la mayor eliminación de HCP en comparación con las etapas de la columna anterior.

15 Pulido con Butyl 650 M

La etapa de cromatografía final dentro del proceso incluyó cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando la resina Butyl 650M. Antes de la cromatografía de HIC, se dejó calentar el eluato de Mimetic Blue a temperatura ambiente antes de la adición de sulfato de amonio. El UV280 del eluato de Mimetic Blue se usó para calcular el número mínimo de ciclos con Butyl 650M que no exceda de 10 g de recAP/L de resina. Para una columna con Butyl 650M de 1,48 L empaquetada, solo se consideró necesario un ciclo para una carga máxima de 5,5 g de recAP/L de resina. Justo antes de la carga de la columna, el eluato de Mimetic Blue se diluyó con AmSO₄ 2,1 M, pH 8,0 hasta una concentración final de AmSO₄ 1,0 M. La carga de la columna se completó dentro de 1 hora de la adición de sulfato de amonio para reducir la posible formación de precipitado. El producto se purificó después usando las condiciones establecidas enumeradas en la Tabla 14. El producto se eluyó con AmSO₄ 0,6 M utilizando un rango UV predefinido de ≥ 0,25 AU/cm a ≤ 0,25 AU/cm. Una vez eluido de la columna, el eluato se diluyó inmediatamente 3X (1 + 2) con WFI y se filtró por PES de 0,2 micras en un BPC estéril de 20 litros (Hyclone) antes del almacenamiento a 2-8°C.

30 Tabla 14. Condiciones de la prueba de cromatografía de pulido con Butyl 650M

Butyl 650M ID 10,0 cm x 18,8 cm BH = 1,48 L					
Bloque	Condición del regulador	#CV	Velocidad de flujo (cm/h)	Dirección de flujo	Otros
Esterilización	NaOH 0,5 M	3,0	≤400	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Equilibrio	Tris 20 mM, AmSO ₄ 1,0 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	3,0	≤400	Hacia abajo	
carga	Eluato de Mimetic Blue ajustado a AmSO ₄ 1,0 M	NA	≤400	Hacia abajo	
Lavado post	Tris 20 mM, AmSO ₄ 1,0 M, MgCl ₂ 2	5,0	≤400	Hacia	

carga	mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0			abajo	
Elución	Tris 20 mM, AmSO ₄ 0,6 M, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM, pH 8,0	5,0 o hasta el final del flujo a través de la recolección	≤250	Hacia abajo	Inicio de recolección a UV ₂₈₀ ≥ 0,25 AU/cm; final de la recolección a UV ₂₈₀ 0,25 AU/cm
Banda	NaCl 2M	3,0	≤400	Hacia abajo	
Esterilización	NaOH 0,5 M	3,0	≤400	Hacia abajo	Sostenido 60 min
Almacenamiento	Etanol al 20%	3,0	≤400	Hacia abajo	

El cromatograma para la etapa de HIC fue consistente con experimentos previos, dando como resultado un pico de eluato con una absorbancia máxima de 1,6 AU. El intermediario del proceso con Butyl 650M se analizó mediante UV280 para concentración, ensayo de actividad de punto final, título RP, qPCR para ADN residual, ELISA de HCP y SEC-HPLC para pureza y se comparó con el intermedio de Mimetic Blue. El eluato mantuvo una alta actividad específica así como recuperaciones en más del 80% para recAP y actividad. La pureza de recAP mediante SEC-HPLC se mantuvo en 99,9%. No se observaron agregados de alto peso molecular (APM) por SEC-HPLC, lo que sugiere que la adición de sulfato de amonio no altera la calidad del producto ni causa la agregación del producto. La concentración de HCP residual estaba por debajo del límite de detección (≤3 ppm) para el ensayo ELISA de HCP. Por lo tanto, la concentración de HCP residual se redujo al menos 12 veces después de la etapa de cromatografía HIC, lo que sugiere que la etapa de HIC era necesaria para una eliminación adicional de HCP a través del proceso.

Ultrafiltración/Diafiltración

La siguiente etapa dentro del proceso incluyó ultrafiltración/diafiltración para el intercambio del regulador así como la concentración del producto. Se utilizó un cartucho Biomax de Ultrafiltración Pellicon 2 de 0,1 m² con un corte de peso molecular de 10 kDa para concentrar el producto seguido de diafiltración para eliminar el sulfato de amonio. La membrana se esterilizó primero con NaOH 0,5 M durante 1 hora, se enjuagó con WFI y se equilibró con regulador de formulación (L-histidina 20 mM, D-sorbitol 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 7,0). El eluato de HIC diluido se calentó a temperatura ambiente antes de cargarlo en la membrana. La carga del producto sobre la membrana fue de 70 g/m². La TMP se mantuvo a ≤15 PSI a lo largo de la prueba usando un flujo cruzado de 0,5 L por minuto para la membrana de 0,1 m². El eluato de Butyl 650M diluido se concentró inicialmente a 14 g/L seguido de una diafiltración 10X con regulador de formulación. La membrana se lavó entonces con aproximadamente 31 mL de regulador de formulación para alcanzar una concentración objetivo de 11,5 g/L por UV280. Una vez que se alcanzó la concentración objetivo, el retenido se filtró usando una unidad de filtro de PES de 0,2 micras y se procesó inmediatamente mediante filtración viral.

La carga y el retenido de UF/DF (con descarga) se analizaron en cuanto a actividad, concentración por UV280, ADN residual por qPCR, pureza por SEC-HPLC y HCP residual. La pureza de recAP se mantuvo al 100%, lo que indica que no hay formación de agregados. La recuperación para la etapa de UF/DF fue de aproximadamente 70%, que fue menor que para la prueba 5 de demostración con 100% de recuperación (2). La misma membrana utilizada en el procesamiento de la prueba 5 de demostración se utilizó para esta prueba de demostración y su reutilización podría atribuirse a la pérdida de producto. La concentración residual de HCP dentro del retenido de UF/DF estaba por debajo del límite de cuantificación del ELISA de HCP.

Filtración viral y llenado a granel

Antes del llenado a granel, la etapa final dentro del proceso fue la filtración viral. Se equilibró un filtro Planova 15N de 0,001 m² con regulador de formulación de 50 L/m² (L-histidina 20 mM, D-sorbitol 250 mM, MgCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 50 µM, pH 7,0). El retenido de UF/DF se aplicó al filtro viral equilibrado a una carga de 430 L/m², manteniendo una presión diferencial de ≤15 psi. Una vez que se aplicó todo el material, el filtro se lavó con 10 L/m² de regulador de formulación para recuperar la proteína en la carcasa del filtro. La descarga se añadió entonces al filtrado para obtener una concentración final de 10,4 g/L. La especificación objetivo para la sustancia farmacéutica a granel fue de 9,0 a 11,0 mg/mL, por lo tanto, la concentración final estaba dentro del intervalo de especificación antes de la filtración por PES. Para la preparación de la BDS, el filtrado viral se filtró luego a través de un sistema de filtro de PES de 0,2 micras en un contenedor de PETG de 1L y se almacenó a 2-8°C.

Se analizaron la carga, el filtrado viral con enjuague y la sustancia farmacéutica a granel por la actividad enzimática, el ADN residual mediante la qPCR, el título de RP, la pureza mediante SEC-HPLC, la concentración por UV280 y la HCP residual por ELISA. Aproximadamente el 98% del producto se recuperó después de la etapa de filtración viral. La actividad específica y la pureza se mantuvieron durante la filtración. El HCP residual estaba muy por debajo de la especificación objetivo de ≤100 ppm dentro de la sustancia farmacéutica a granel. Este resultado confirmó que el

proceso refinado era capaz de una mayor eliminación de HCP que el proceso de referencia, que oscilaba alrededor de 100 ppm a lo largo de las pruebas de demostración previas.

Resumen de los resultados de la prueba de demostración

5

Una vez completada la prueba de demostración, los resultados analíticos para cada proceso intermedio se tabularon y se presentaron en la Figura 16. El factor más importante para esta prueba de demostración fue la eliminación espectacular de HCP hasta <0,5 ppm, muy por debajo de la especificación objetivo de <100 ppm, utilizando las condiciones refinadas que se habían establecido adicionalmente para las etapas de la columna con Capto Adhere y Mimetic Blue (1).

10

Prueba de estabilidad

Se realizaron pruebas de estabilidad con las formulaciones obtenidas en el Ejemplo 3. Los resultados de las formulaciones en regulador de histidina y en regulador de citrato en las condiciones indicadas se resumen en la Figura 17.

15

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende una fosfatasa alcalina aislada que se ha expresado en un sistema de expresión basado en células, caracterizada porque la composición comprende menos de 100 ppm de una proteína de la célula huésped (HCP) y en la que la composición forma menos de 20 partículas que son de 50 µm de diámetro o más en 1 mL de la composición durante la prueba de estabilidad a 2-8°C durante 2 meses.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición tiene un pH de entre 6,5-7,5.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición comprende entre 10-40 mM de citrato o entre 5-40 mM de histidina.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que la composición comprende entre 200-300 mM de sorbitol y/o entre 10-40% de glicerol.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la fosfatasa alcalina es una proteína que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 20 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la fosfatasa alcalina es una proteína que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la fosfatasa alcalina es una proteína que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 25 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la HCP es una proteína de tipo catepsina.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el sistema de expresión basado en células comprende una célula huésped de mamífero.
- 30 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el sistema de expresión basado en células comprende una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO).
- 35 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso como un medicamento.

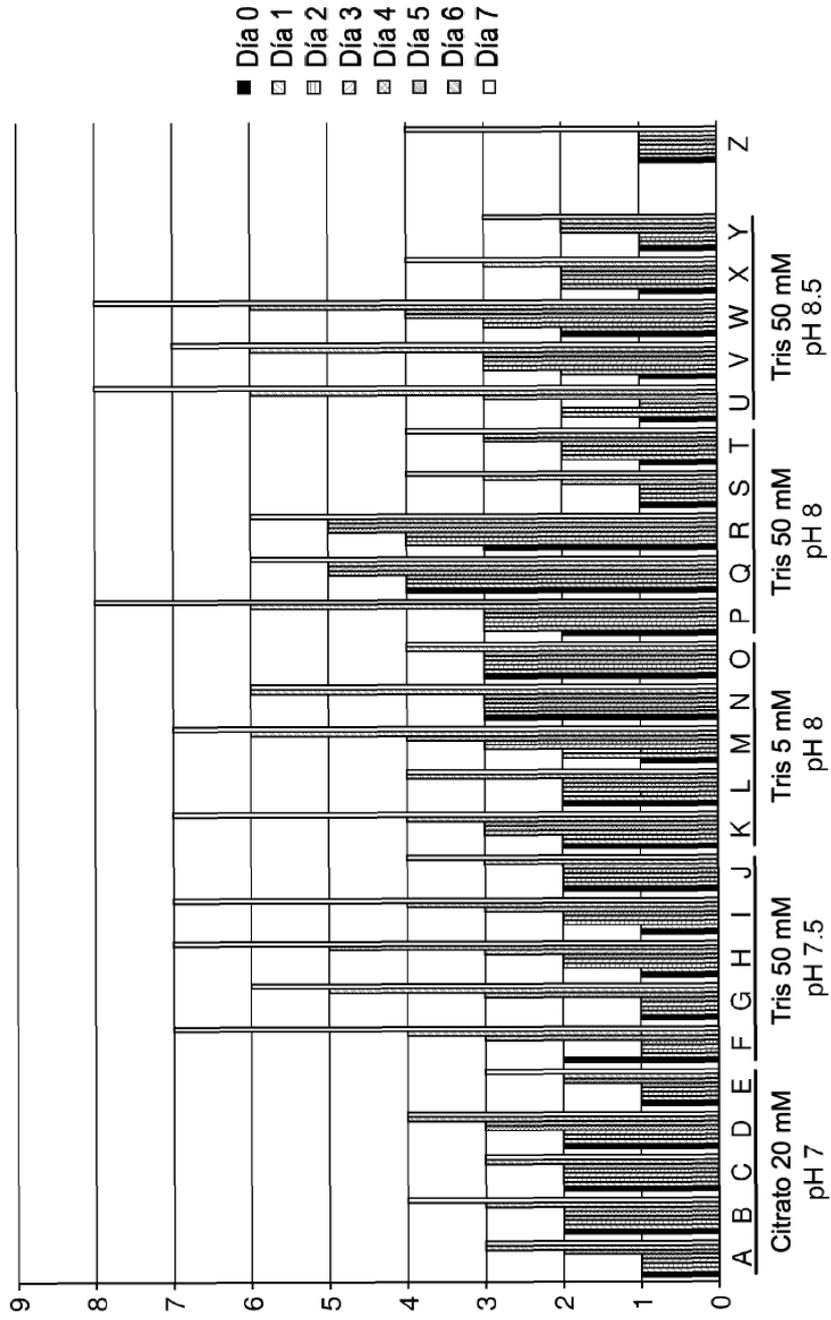


FIG. 1

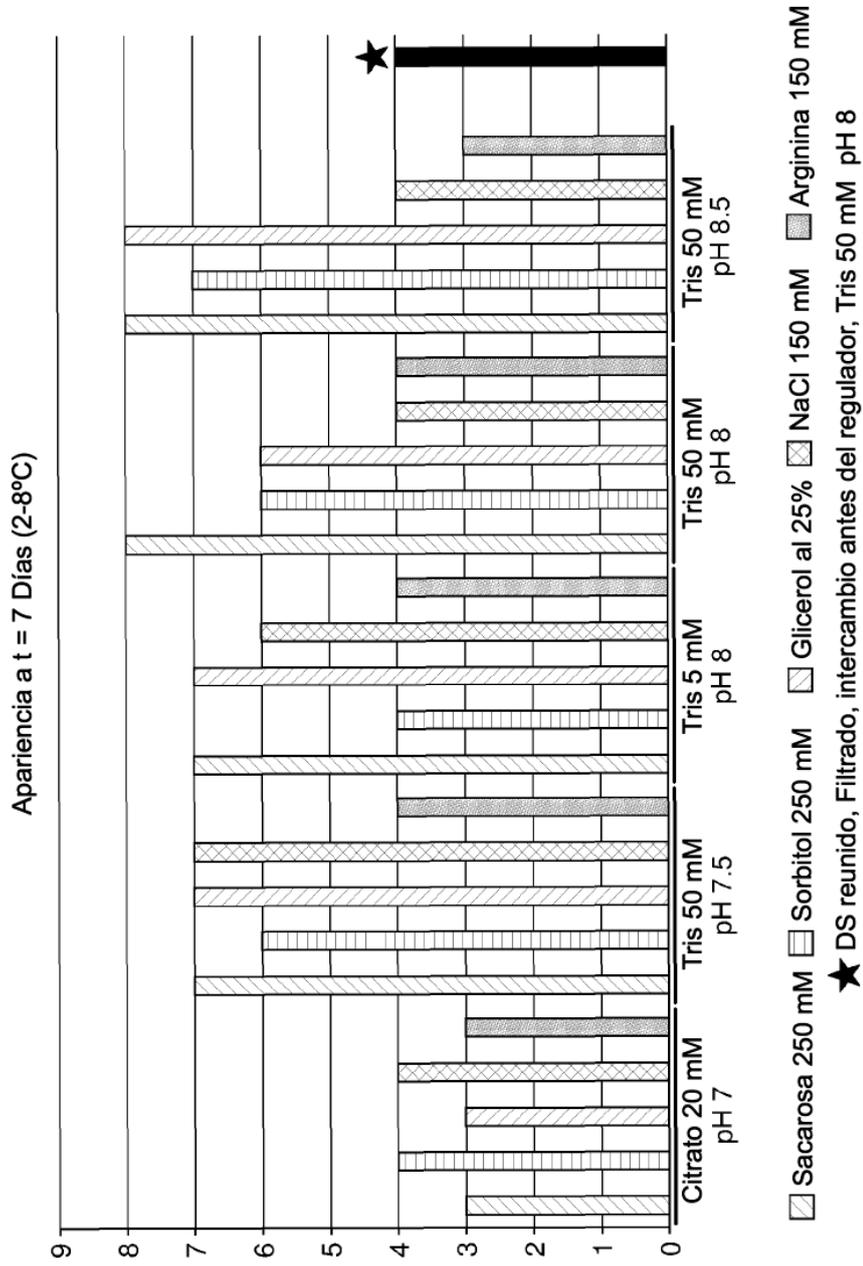


FIG. 2

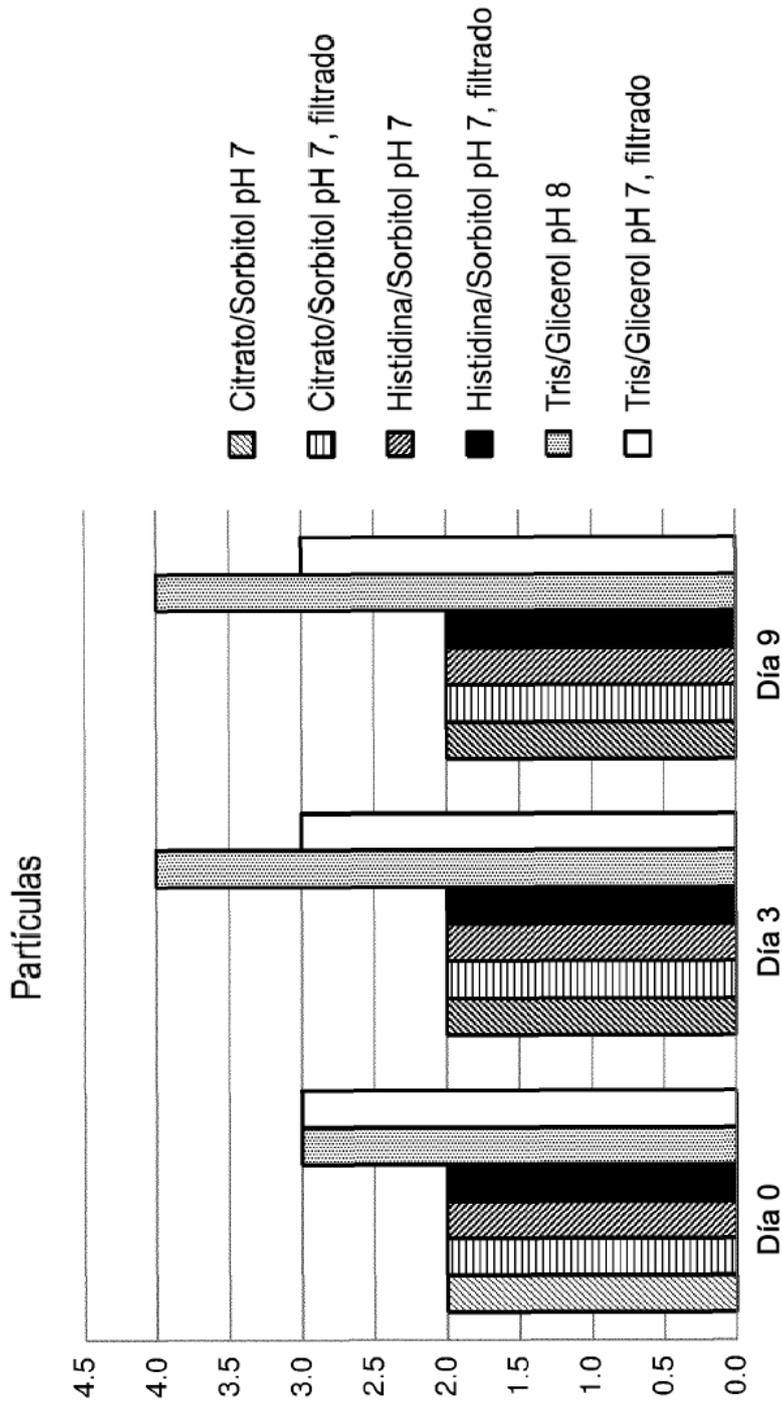


FIG. 3

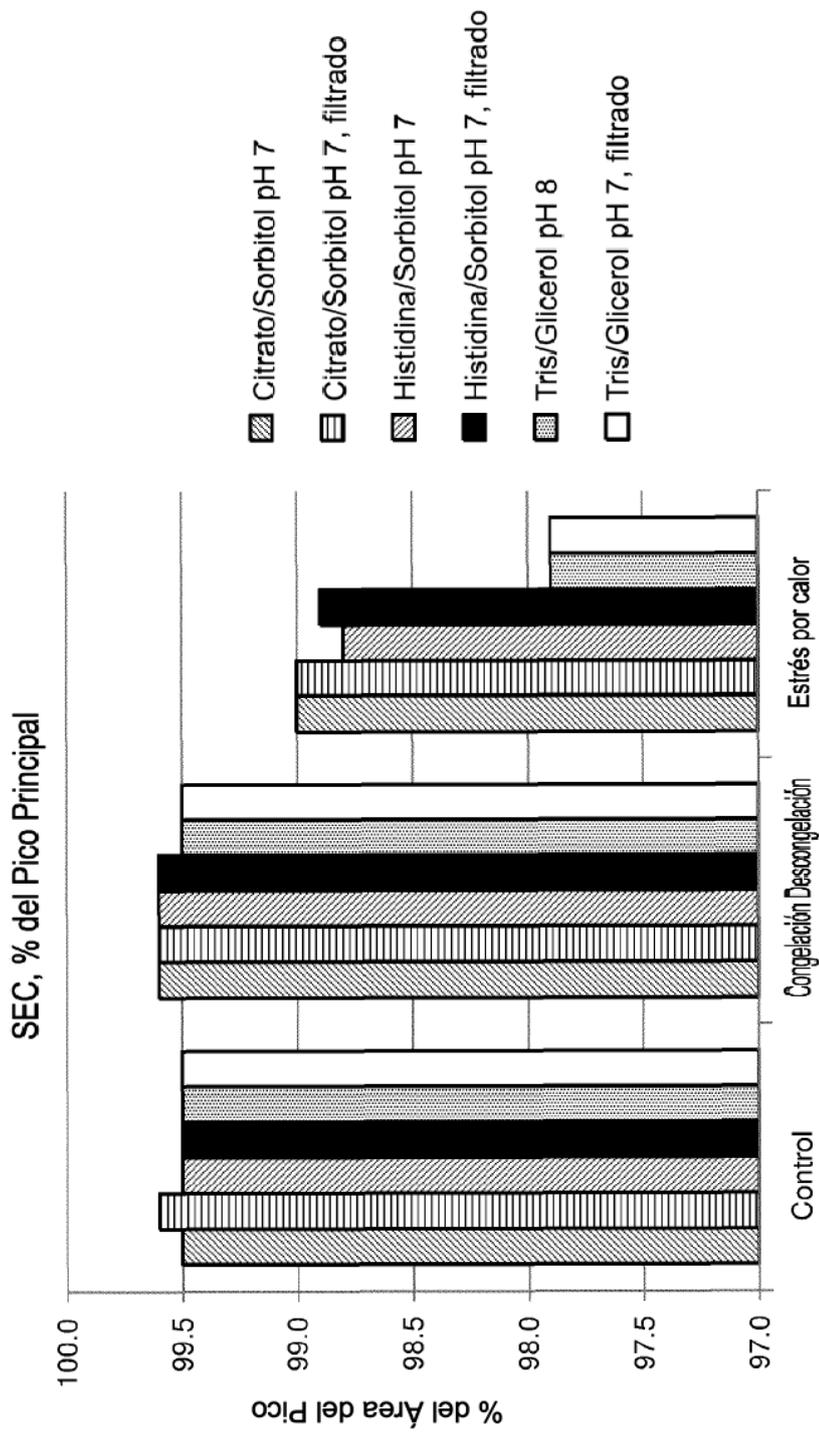


FIG. 4

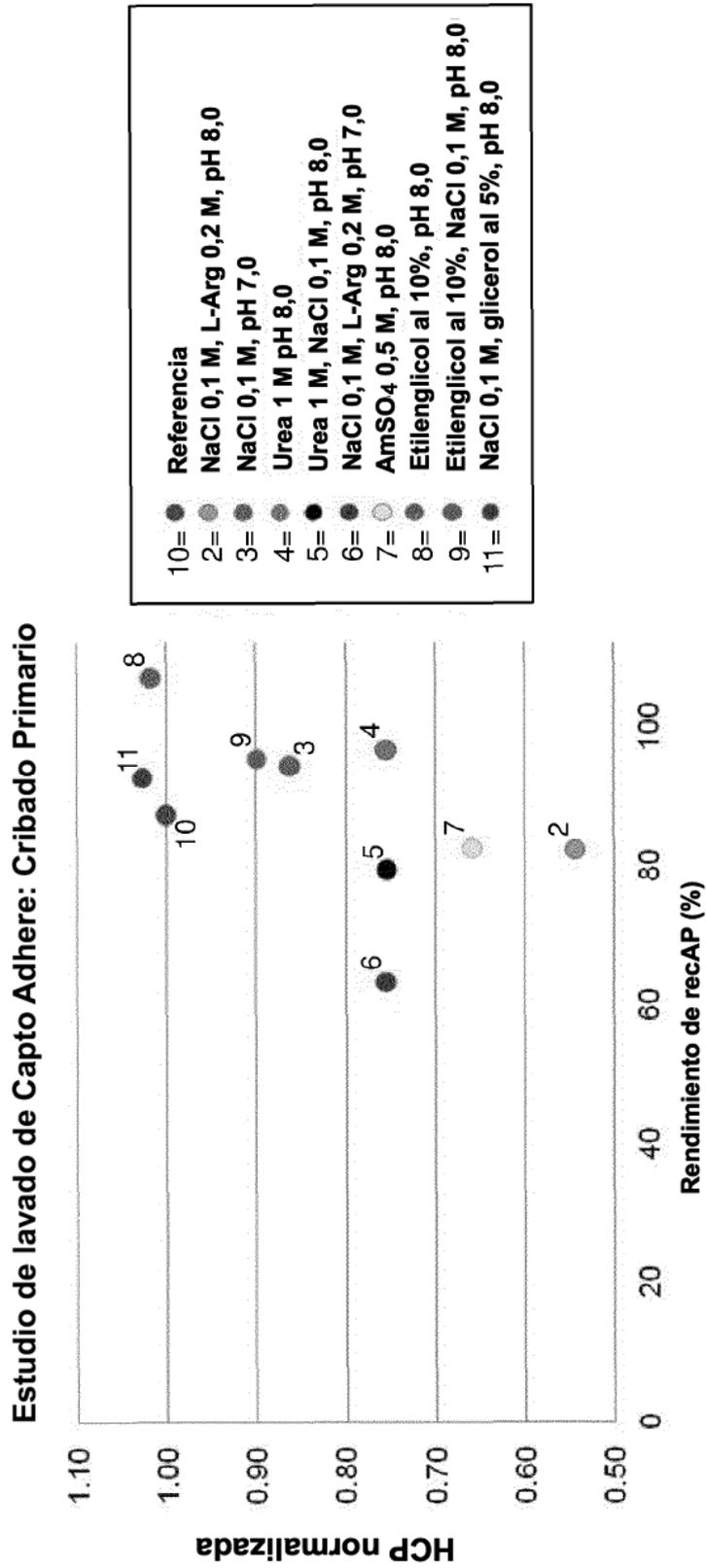


FIG. 5A

Etiqueta	ID	Prueba de la condición de lavado	HCP cruda (ppm)	HPC normalizada	Rendimiento recAP (%)
	Método de ensayo		ELISA/RPHPLC		Titulación de RP
	1x15L carga CCH	N/A	1.059.844	N/A	N/A
10= ●	Prueba 10 (Referencia)	N/A	554.979	1,00	87
2= ●	Prueba 2	Tris 20 mM, NaCl0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	288.414	0,52	82
3= ●	Prueba 3	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl0,1 M, pH 7,0	440.017	0,79	94
4= ●	Prueba 4	Tris 20 mM, urea 1M, pH 8,0	376.044	0,68	97
5= ●	Prueba 5	Tris 20 mM, urea 1M, NaCl0,1 M, pH 8,0	454.348	0,82	79
6= ●	Prueba 6	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 7,0	570.808	1,03	63
7= ●	Prueba 7	Tris 20 mM, AmSO ₄ 0,5 M, pH 8,0	381.564	0,69	82
8= ●	Prueba 8	Tris 20 mM, etilenglicol al 10%, pH 8,0	462.249	0,83	107
9= ●	Prueba 9	Tris 20 mM, etilenglicol al 10%, NaCl 0,1 M pH 8,0	456.278	0,82	95
11= ●	Prueba 11	Tris 20 mM, glicerol al 5%, NaCl0,1 M pH 8,0	536.661	0,97	93

FIG. 5B

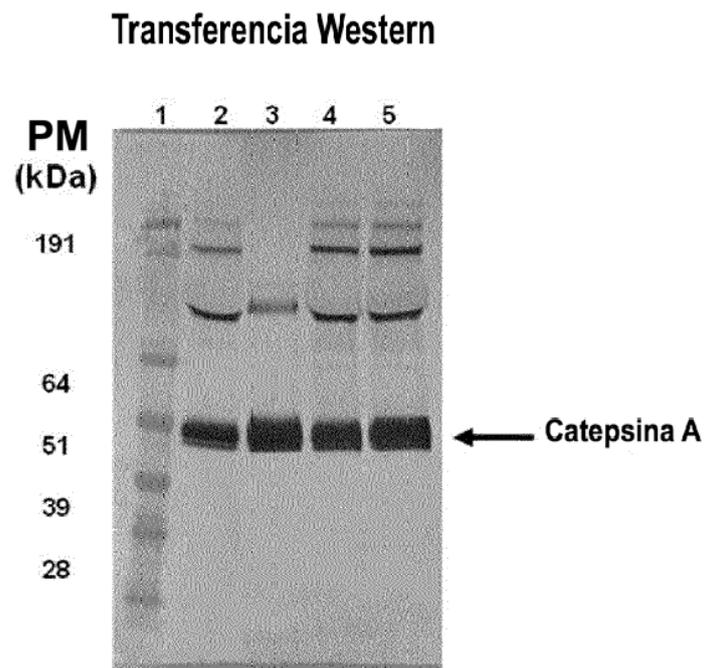


FIG. 6A

Gel Carril	ID de lavado de prueba	Matriz de la muestra	HCP cruda (ppm)	HCP normalizada	Rendimiento del recAP del eluato (%)
1	MWM	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Eluato de la prueba 2 con Capto	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	288.414	0,52	82
3	Lavado intermedio de la prueba 7 con Capto	AmSO ₄ 0,5 M, pH 8,0	N/A	N/A	N/A
4	Eluato de la prueba 7 con Capto	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	381.564	0,69	82
5	Eluato de la prueba 10 con Capto (línea base)	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	554.979	1,00	87

FIG. 6B

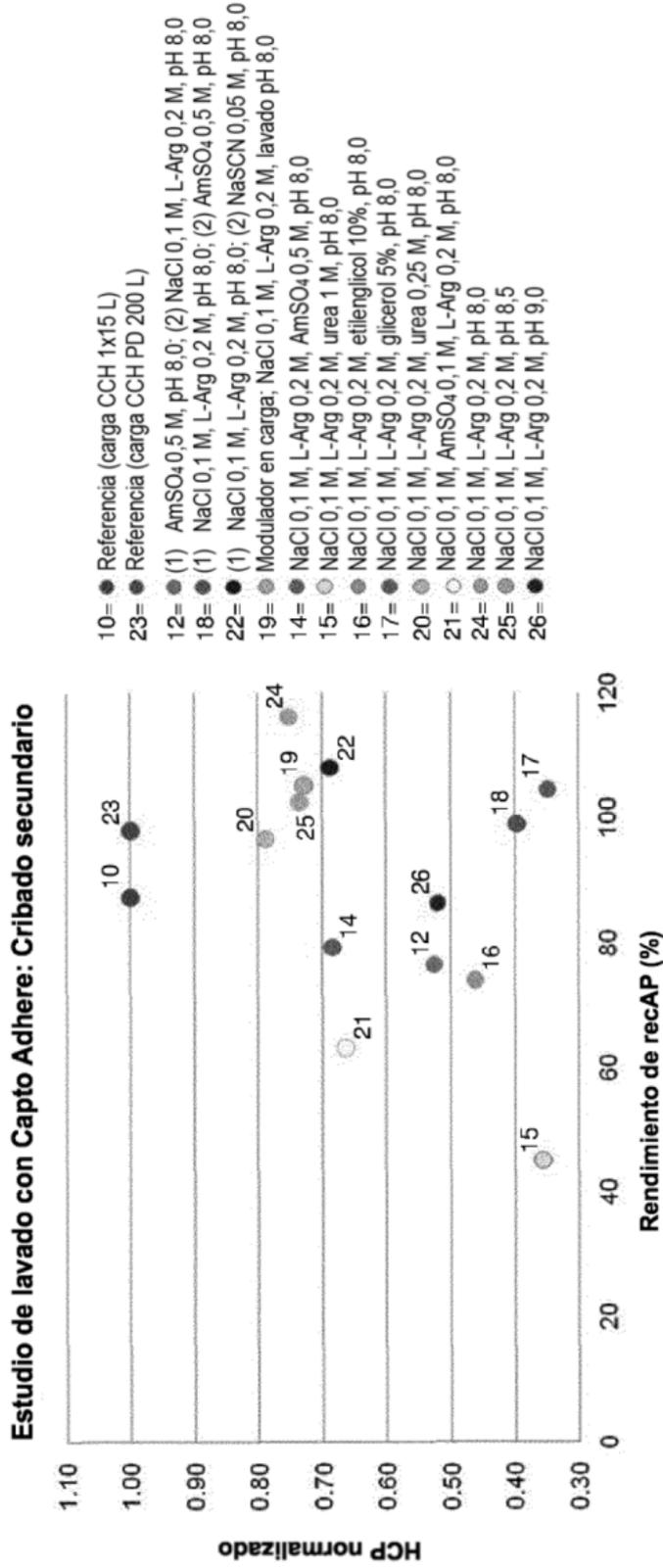


FIG. 7A

ID	Condición de lavado de prueba	Material de carga	HCP crudo (ppm)	HCP normalizada	Rendimiento recAP (%)
Método de ensayo			ELISA/ RPHPLC	ELISA/ RPHPLC	Titulación de RP
Carga CCH 1x15 L	N/A	N/A	1.059.844	N/A	N/A
Carga CCH PD 200 L	N/A	N/A	952.724	N/A	N/A
Pruebas Control de referencia					
Prueba 10 (referencia)	N/A		554.979	1,00	87
Prueba 23 (referencia)	N/A	Carga CCH PD 200 L	402.669	1,00	98
Lavados secuenciales					
Prueba 12	(1) AmSO ₄ 0,5 M, pH 8,0 (2) NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	291.665	0,53	76
Prueba 18	(1) NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 (2) AmSO ₄ 0,5 M, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	220.244	0,40	99
Prueba 22	(1) NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0 (2) NaSCN 0,05 M, pH 8,0	Carga CCH PD 200 L	277.232	0,69	108
Moduladores en la carga					
Prueba 19	Carga ajustada con NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0; lavado con Tris 20 mM, NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	Carga CCH PD 200 L	293.43	0,73	105
Lavados de combinación con moduladores					
Prueba 14	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, AmSO ₄ 0,5 M, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	379.902	0,68	79
Prueba 15	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, urea 1,0 M, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	197.747	0,36	45
Prueba 16	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, etilenglicol al 10%, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	255.905	0,46	74
Prueba 17	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, glicerol al 5%, pH 8,0	Carga CCH 1x15 L	193.135	0,35	104
Prueba 20	NaCl 0,1M, urea 0,25 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	Carga CCH PD 200 L	317.491	0,79	97
Prueba 21	NaCl 0,1M, AmSO ₄ 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	Carga CCH PD 200 L	267.252	0,66	63
Lavados de pH alterado					
Prueba 24 (repetir)	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	Carga CCH PD 200 L	302.694	0,75	116
Prueba 25	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 8,5	Carga CCH PD 200 L	296.208	0,74	102
Prueba 26	NaCl 0,1M, L-Arg 0,2 M, pH 9,0	Carga CCH PD 200 L	209.510	0,52	86
Los valores de HPLC para cada eluato se normalizaron con el eluato de referencia correspondiente utilizando el mismo material de carga					

FIG. 7B

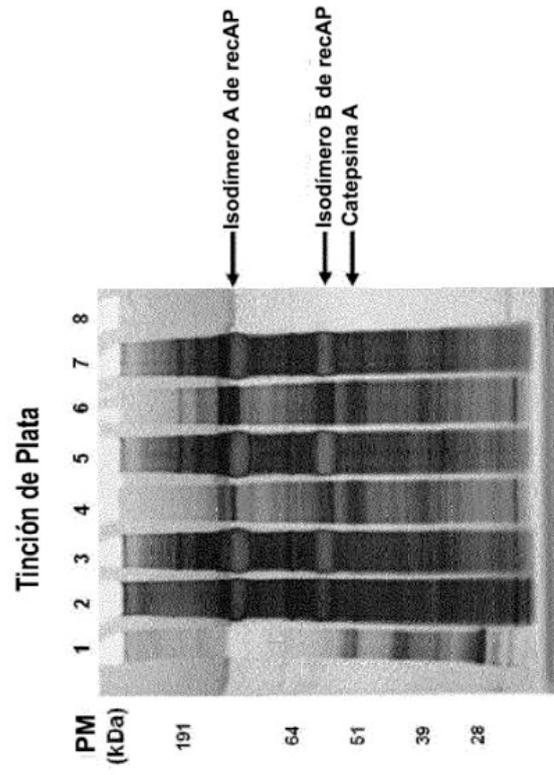


FIG. 8B

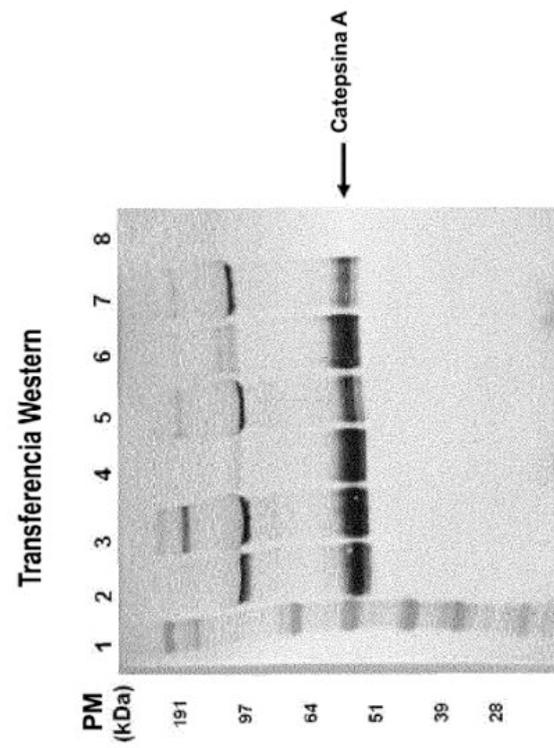


FIG. 8A

Gel Línea	ID Muestra	Matriz de muestra	HPC crudo (ppm)	HCP normalizado	Rendimiento de recAP en el eluato (%)	Carga de transferencia (µg)	Carga de plata (µg)
1	MWM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Carga CCH 1x15 L	Componentes del medio	1.059.844	N/A	N/A	6,50	3,3
3	Eluato de referencia Prueba 10	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	554.979	1,00	87	10	5,0
4	Lavado intermedio prueba 2	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,2 M, pH 8,0	N/A	N/A	N/A	0,10	0,1
5	Eluato prueba 2	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	288.414	0,54	82	10	5,0
6	Lavado intermedio prueba 17	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, glicerol al 5%, pH 8,0	N/A	N/A	N/A	1,30	0,7
7	Eluato prueba 17	NaCl 0,1 M, L-Arg 0,55 M, pH 8,0	193.135	0,35	104	10	5,0
8	Blanco de regulador	Regulador de muestra 1xLDS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

FIG. 8C

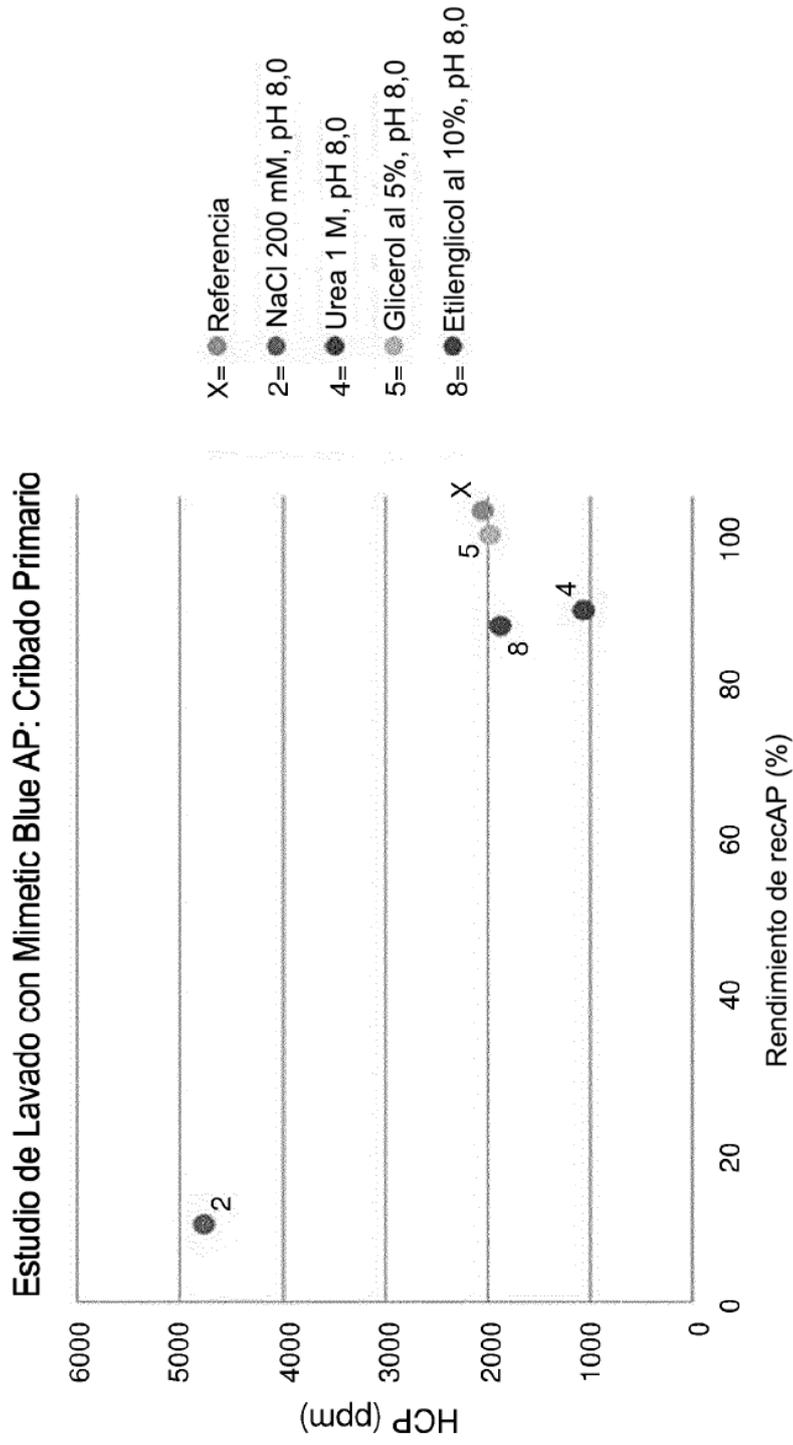
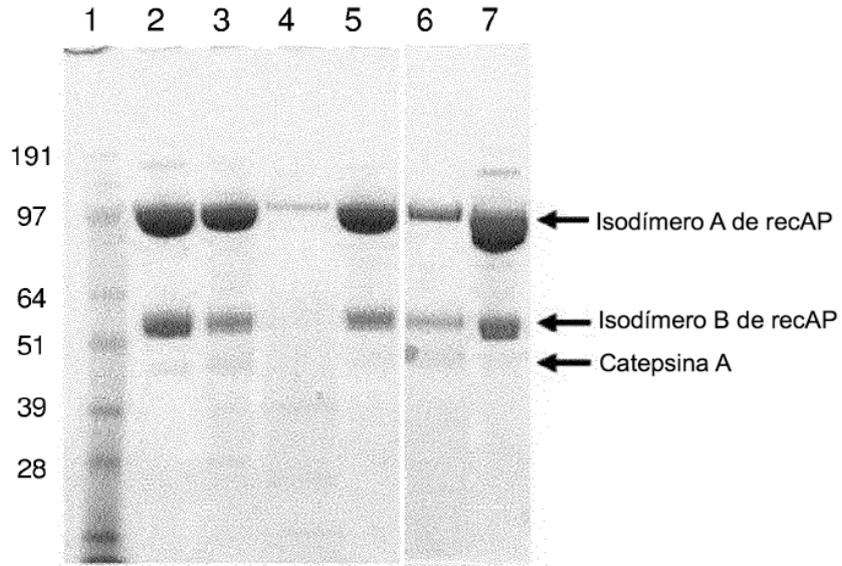


FIG. 9A

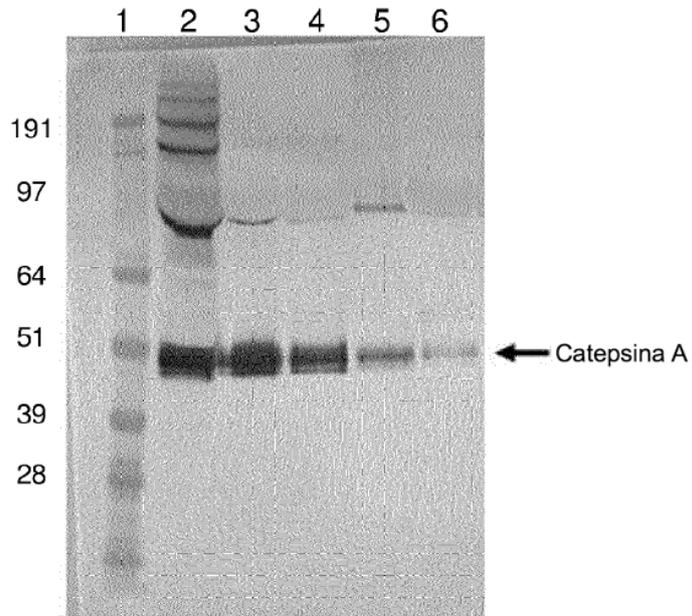
Etiqueta	ID	Prueba de la condición de lavado	HCP cruda (ppm)	HPC normalizada	Rendimiento recAP (%)
N/A	Eluato de Poros				
X= ●	Referencia	N/A	95.591	N/A	N/A
2= ●	Prueba 2	N/A	2.047	1.00	
N/A	Prueba 3	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM NaCl 200 mM, pH 8,0	4.767	2,32	87
4= ●	Prueba 4	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, NaCl 100 mM, pH 8,0	Eluato no recogido:	aproximadamente	rendimiento del 40%
5= ●	Prueba 5	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM urea 1 M, pH 8,0	1.066	0.52	90
N/A	Prueba 6	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM glicerol al 5%, pH 8,0	1981	0.97	100
N/A	Prueba 7	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, NaSCN 0,2 mM, pH 8,0	Producto eluido en lavado		0
N/A	Prueba 8	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM, Arginina 200 mM, pH 8,0	Producto eluido en lavado		0
8= ●	Prueba 8	Tris 20 mM, MgCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 50 μM etilenglicol al 10%, pH 8,0	1.878	0,92	88

FIG. 9B



Carril	ID de la Muestra	Masa (μg)
1	MWM	N/A
2	Estándar de Referencia de recAP	5.0
3	Carga de Mimetic Blue	5.1
4	Prueba 1: Flujo a través de	2.9
5	Prueba 1: Eluato	5.0
6	Prueba 4: Lavado intermedio con urea 1 M	1.8
7	Prueba 4: Eluato	5.0

FIG. 10A



Carril	ID de la Muestra	Masa (µg)
1	MWM	N/A
2	Eluato de Capto Adhere	10.0
3	Carga de Mimetic Blue	10.0
4	Prueba 1: Eluato	10.0
5	Prueba 4: Lavado intermedio con urea 1 M	1.8
6	Prueba 4: Eluato	10.0

FIG. 10B

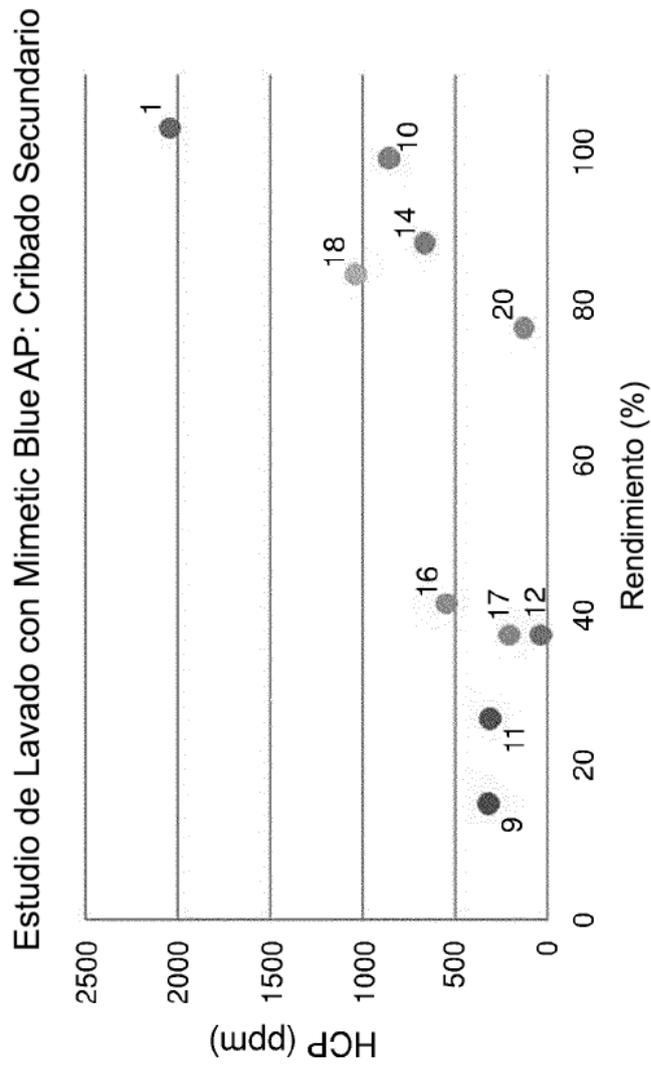


FIG. 11A

Etiqueta	ID	Prueba # con Capto Adhere	Prueba de la condición de lavado (Tris 20 mM, MgCl ₂ , 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM)	Regulador de elución NaCl conc.	HPC (ppm)	HCP Normalizado	Rendimiento de recAP (%)
1 = ●	Referencia (prueba 1)	1	N/A	130 mM	2.047	1,00	103
9 = ●	Prueba 9	1	Urea 1 M + etapas de NaCl 20, 40, 60 mM	130 mM	323	0,16	15
10 = ●	Prueba 10	1	Ninguno (control de regulador de elución)	4.767	862	0,42	99
11 = ●	Prueba 11	1	urea 1 M, pH 8,0 etapas de NaCl 20, 40, 60 mM, pH 8,0	ninguno	314	0,15	26
12 = ●	Prueba 12	1	etapas de arginina 20, 40, 60 mM	ninguno	<40*	0,02	37
14 = ●	Prueba 14	2	Ninguno (control para nuevas etapas de lavado con Capto Adhere	ninguno	667	0,33	88
16 = ●	Prueba 16	2	etapas de NaCl 20, 40, 60 mM, pH 8,0	ninguno	547	0,27	41
17 = ●	Prueba 17	2	Urea 1 M + etapas de NaCl 20, 40, 60 mM, pH 7,0	ninguno	212	0,10	37
18 = ●	Prueba 18	2	etapas de NaCl 20, 40, 60 mM, pH 7,0	ninguno	1.042	0,51	84
20 = ●	Prueba 20	2	Etilenglicol al 10% + etapas de NaCl 20, 40, 60 mM, pH 7,0	ninguno	128	0,06	77

*Inferior a LOQ

FIG. 11B

Gel Línea	Estudio	ID de la muestra	Condición de la prueba	Concentración de recAP (mg/mL)	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)
1	MWM					
2	Eluato de Poros diluido 2X	Carga	Referencia	1,27	111.125	87.500
3	Prueba#1 de MB	Eluato	Referencia	3,38	7.389	2.047
4	Prueba#8 de MB	Eluato	Lavado con etilenglicol al 10%	2,83	5.654	1.878
5	Prueba#10 de MB	Eluato	Elución solo con fosfato	3,02	2.499	862
6	Prueba#10 de MB	Eluato	Elución solo con fosfato	0,02	106.133	>1.000.000
7	Prueba#12 de MB	Eluato	Etapa con arginina 20 mM	0,07	4.631	62.030
8	Prueba#12 de MB	Banda	Etapa con arginina 40 mM	0,04	6.688	168.560
		Lavado 1	Etapa con arginina 60 mM	0,10	6.540	64.303
		Lavado 2	Etapa con arginina 80 mM	0,23	14.015	61.875

FIG. 12A

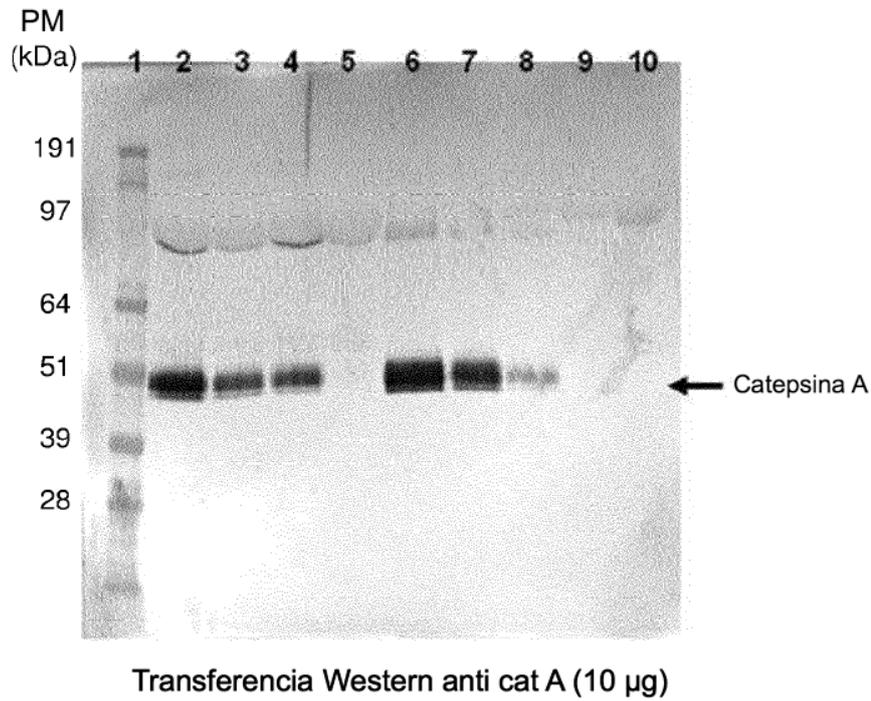


FIG. 12B

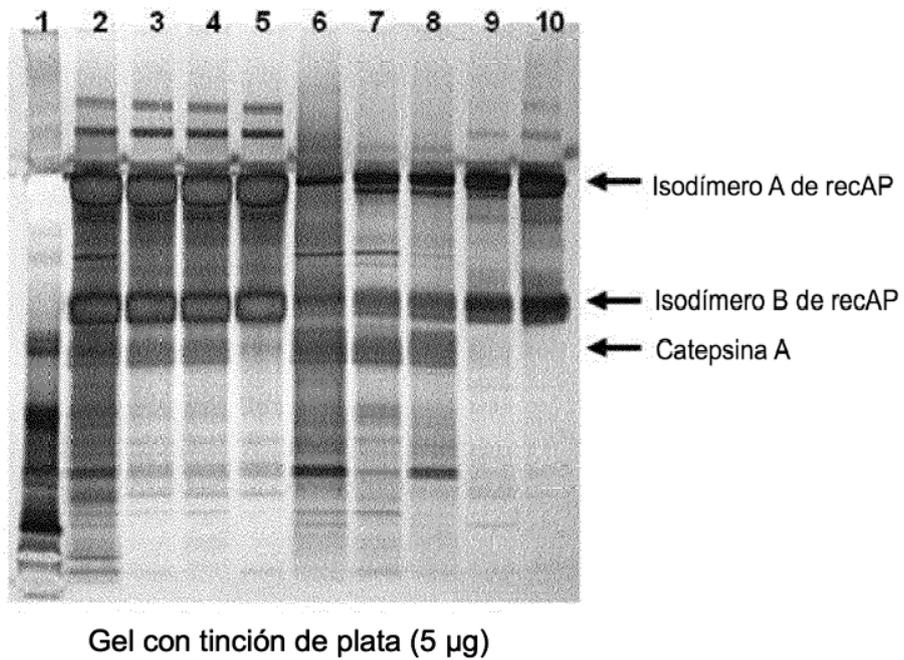


FIG. 12C

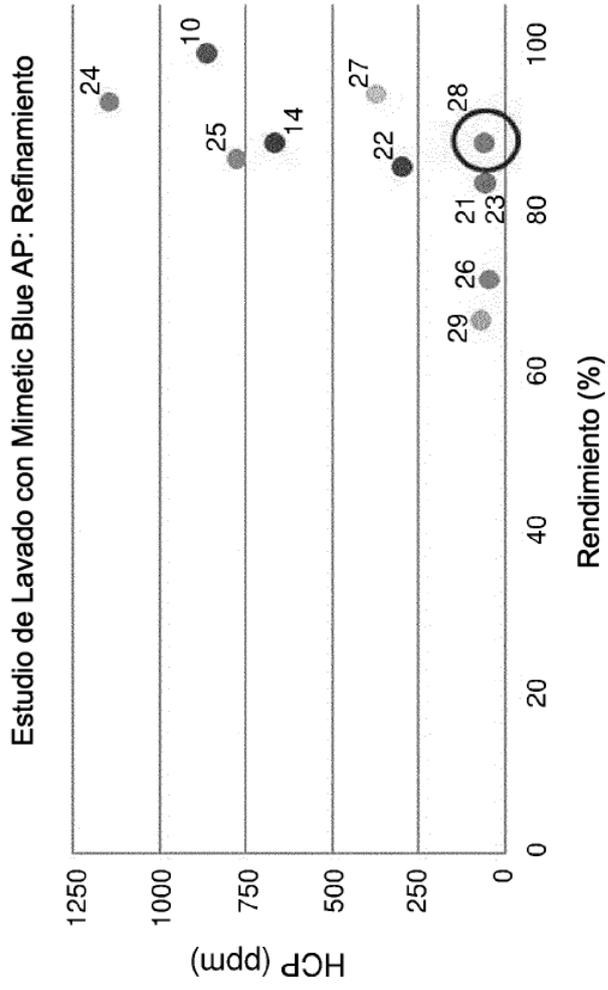
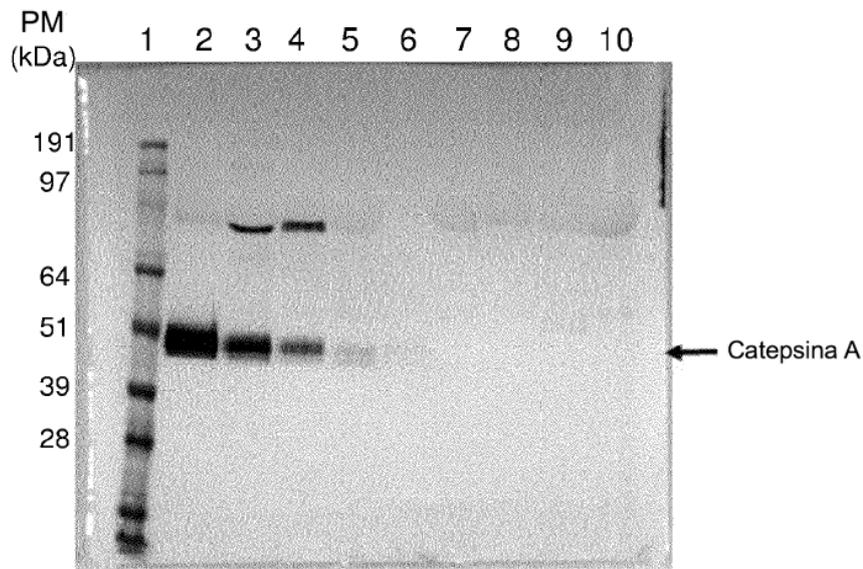


FIG. 13A

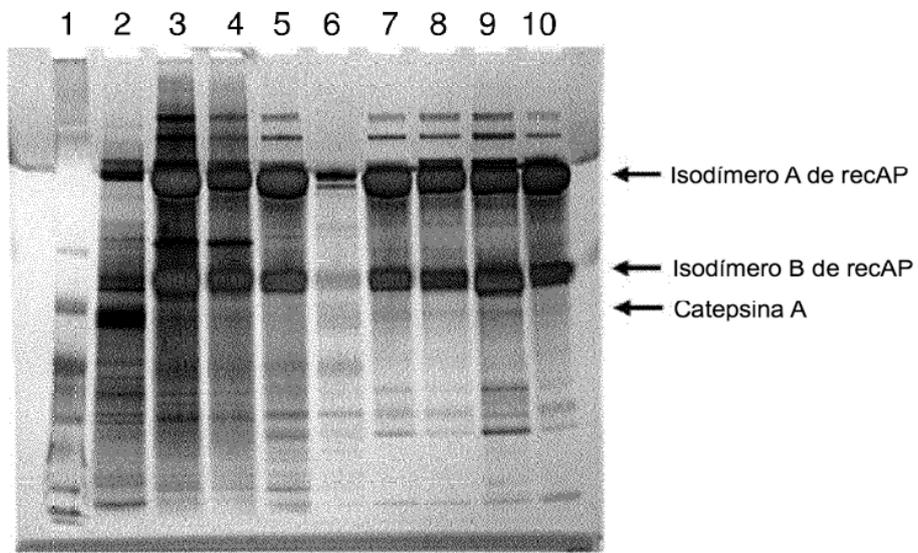
Etiqueta	ID	Prueba # con Capto Adhere	Prueba de la condición de lavado (Tris 20 mM, MgCl ₂ , 2 mM, ZnCl ₂ 50 µM)	Densidad de carga (g recAP/L de resina)	Regulador de elución NaCl conc.	HCP (ppm)	HCP Normalizado	Rendimiento de recAP (%)
10=●	Prueba 10	1	Ninguno (control de regulador de elución)	2,2	ninguno	862	0,42	99
14=●	Prueba 14	2	Ninguno (control para nueva etapa de lavado con Capto Adhere)	1,8	ninguno	667	0,33	88
21=●	Prueba 21	2	Urea 1 M	1,8	ninguno	59	0,03	83
22=●	Prueba 22	2	Urea 2 M	1,8	ninguno	299	0,15	85
23=●	Prueba 23	2	Arginina 40 mM	1,8	ninguno	54	0,03	83
24=●	Prueba 24	3	Ninguno (control para nuevo lote de carga)	2,3	ninguno	1.145	0,56	93
25=●	Prueba 25	3	Etilenglicol al 10% + urea 1 M	2,3	ninguno	777	0,38	86
26=●	Prueba 26	3	Arginina 40 mM + Urea 1 M	2,3	ninguno	46	0,02	71
27=●	Prueba 27	3	Urea 1 M	3,0	ninguno	371	0,18	94
28=●	Prueba 28	3	Arginina 40 mM	3,0	ninguno	59	0,03	88
29=●	Prueba 29	3	Arginina 40 mM + Urea 1 M	3,0	ninguno	68	0,03	66

FIG. 13B



Transferencia Western anti cat A (10 μ g)

FIG. 14A



Gel con tinción de plata (5 μ g)

FIG. 14B

Gel Carril	ID de la muestra	Carga de transferencia (μg)	Carga de plata (μg)
1	MWM		
2	Lavado de catA en Capto Adhere	1,5	0,8
3	Eluato de Capto Adhere	10,0	5,0
4	Carga de Poros	5,1	2,6
5	Eluato de poros	10,0	5,0
6	Lavado de catA en Mimetic Blue	0,5	0,2
7	Eluato de Mimetic Blue	10,0	5,0
8	Eluato de Butyl	6,8	3,4
9	Banda de Butyl	8,6	4,3
10	Retenido de UF/DF	10,0	5,0

FIG. 14C

ID	Pruebas de productos relacionados		Pruebas de impurezas HCP (ppm)
	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento de recAP (% recuperado)	
Método de ensayo	Actividad/ RP-HPLC		ELISA / RP-HPLC
Carga e CCH	559	100	952.724
Eluato de Capto Adhere	516	93	307.976
Eluato de Poros	559	61	85.484
Eluato de Mimetic Blue	533	84	34
Eluato de HIC diluido 3X	502	86	<11
Retenido de UF/DF	543	82	<2

* Para prevenir la dilución del retenido de UF, el enjuague del regulador de la membrana no fue adicionado al retenido. Se determinó el título de LVL-recAP del enjuague, pero no fue analizado por actividad

FIG. 15

ID	Pruebas de productos relacionados		Pruebas de impurezas
	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento de LVL-recAP (% recuperado)	
Método de ensayo	Actividad/ RP-HPLC		HCP (ppm)
			ELISA / RP-HPLC
CCH PD 200 L	497	100	837.175
Eluato de Capto Adhere	499	99	220.191
Eluato de Poros	534	63	68.454
Eluato de Mimetic Blue	532	92	36
Eluato diluido 3X de HIC	484	87	<3
Retenido de UF/DF	548	70	<1
Filtrado viral	539	98	<1
BDS	586	98	<1

FIG. 16

Estabilidad de la prueba 6 de demostración – Apariencia física												
temperatura	T = 0	T = 2 semanas			T = 4 semanas			25°C	5°C	25°C		
		-75°C	5°C	25°C	-75°C	5°C	25°C					
Formulación 1 Histidina/ sorbitol pH 7	n/a	Clara, Incolora y libre de partículas visibles										
Formulación 1 Citrato/ sorbitol pH 7	Clara, Incolora y libre de partículas visibles											

temperatura	T = 2 meses			T = 3 meses			25°C	5°C	25°C
	-75°C	5°C	25°C	-75°C	5°C	25°C			
Formulación 1 Histidina/ sorbitol pH 7	Clara, Incolora y libre de partículas visibles								
Formulación 1 Citrato/ sorbitol pH 7	Clara, Incolora y libre de partículas visibles								

FIG. 17

SECUENCIA DE RECAP (SEQ ID NO: 1)

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLOPIQKVAKNLILFLGDGLGVPVTATRIILKQKNGKLGFPETPLAMDRFPYLALSKITYNVDRQVPDPSAATATAYL
101 CGVKANFQTIIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDDMPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVIL
201 GGRKYNMFPMGTPDPEYFADASQNGIRLDGKNLVQEWLAKHQGAWYVWNRIELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDIKYEILRDPITLDP^{SL}MEMTEAALLRLLS
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQAVTEAVMFD^{DA}IERAGQLTSEEDTLTIVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGGYV
401 LKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVFLDEETHGGEDVAVFARGPQ^{AHL}VHGVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLALPACTTD

FIG. 18