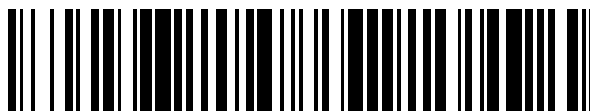


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 348**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/EP2012/060313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12729907 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2714714**

54 Título: **Solución y método de lavado para cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

01.06.2011 US 201161492092 P

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

02.11.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

FRAUENSCHUH, ACHIM

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 688 348 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

Solución y método de lavado para cromatografía de afinidad

Antecedentes de la Invención

5 La eliminación eficiente de impurezas durante la cromatografía de afinidad, incluyendo las proteínas de células huésped (HCPs), y las impurezas relacionadas con el producto, tales como las especies de alto peso molecular (HMWs) y de bajo peso molecular (LMWs), es un factor crucial durante el procesamiento corriente abajo de las proteínas. La pureza de la proteína después del primer paso de purificación (el "paso de captura"), notoriamente tiene influencia sobre el tipo y número de pasos subsiguientes requeridos para generar un producto purificado. El paso de captura también es crítico debido a que concentra el producto, lo cual permite el uso de columnas
10 proporcionalmente más pequeñas y menos costosas en los siguientes pasos de purificación. Por consiguiente, es importante optimizar la eliminación de impurezas durante el primer paso de cromatografía. En el caso de la purificación de anticuerpos, este primer paso típicamente se basa en la afinidad con la proteína A o sus derivados.

Se requieren condiciones de bajo pH (por ejemplo, entre un pH de 3 a 4) para eluir la proteína objetivo enlazada a partir de la columna de afinidad, pero tienen el inconveniente de inducir potencialmente la aglomeración. Históricamente, se han utilizado condiciones menos restrictivas, tales como un pH de entre 5 y 5.5 para lavar de la columna las impurezas no específicamente enlazadas, mientras que simultáneamente se conserva la interacción del objetivo – proteína A. La recuperación, sin embargo, con frecuencia disminuye debido a la elución parcial de la proteína objetivo bajo estas condiciones, en particular cuando se trabaja con altas densidades de carga.

Se ha demostrado que el aminoácido arginina solubiliza ciertas proteínas precipitadas (M, Tsumoto K, Nitta S, Adschiri T, Ejima D, Arakawa T, y Kumagai I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 189-197 (2005); Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. *J Biol Chem.* Marzo 14, 2003; 278(11): 8979-87), reduce la formación de aglomerados (Arakawa T, Tsumoto K. *Biochem Biophys Res Commun.* Abril 25, 2003; 304(1): 148-52), y Arakawa T, *Biophys. Chem.* 127 (2007), páginas 1–8 (Reseña)), y reduce la adsorción no específica de las proteínas a las superficies (Ejima D, J Chromato A, 05 y Schneider CP, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009), páginas 2050–2058). Más aún, en contraste con el clorhidrato de guanidinio, no se ha demostrado que la arginina no despliegue las proteínas (Arakawa T, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003), páginas 148–152 y Nakakido M, *Biophys. Chem.* 137 (2008), páginas 105–109).

Como tal, la arginina se ha utilizado para eluir proteínas a partir de columnas de cromatografía de afinidad y otros tipos de columnas de purificación. Por ejemplo, Arakawa et al., describen métodos para eluir anticuerpos a partir de una columna de proteína A utilizando un regulador de elución que contiene de 0.5 a 2.0 M de arginina a un pH de 4.1 a 5.0 (Arakawa et al. (2004) *Protein Expression and Purification* 36: 244-248; Tsumoto, K. et al. (2004) *Biotechnol. Prog.* 20: 1301-1308; Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20050176109). Adicionalmente, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,501,495 por Ejima et al., describe métodos para eluir proteínas a partir de una columna de filtración de gel mediante una solución en desarrollo que contiene clorhidrato de arginina. Ghose et al., describen métodos para eluir proteínas de interés a partir de sílice no derivada utilizando un gradiente de arginina como el eluyente (Ghose, S. et al. (2004) *Biotech. Bioeng.* 87: 413-423). La Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20030050450 por Coffman et al., describe métodos para disociar moléculas que contienen Fc a partir de complejos de la molécula que contiene Fc y la proteína A, en donde los complejos de Fc/Proteína se aplican a una columna de interacción hidrofóbica (HIC), y la columna se lava con un regulador que contiene arginina.

Barron et al., describen una solución de lavado intermediaria para la cromatografía de Proteína A que contiene de 0.5 a 2.0 M de arginina en un regulador de fosfato/acetato a un pH de 5.0 a 7.5 (óptimamente arginina 1M, regulador de fosfato/acetato 0.1M a un pH de 5.0). Se reporta que este paso de lavado de arginina remueve los contaminantes de proteínas de células huésped (HCPs). Los autores también probaron una solución de lavado intermediaria que contenía cloruro de sodio en 0.5 a 2.0 M a un pH de 5.0 a 7.5, y reportaron que el lavado con NaCl no mostró una disminución significativa en las proteínas de células huésped (HCPs) (Barron et al., "Improving Purity on Protein A Affinity Media Through Use of an Arginine Intermediate Wash Step", <http://www.priorartdatabase.com/IPCOM/000127319>). Más aún, Barron et al., reportaron que la reducción del pH del regulador de lavado tuvo un efecto benéfico bajo las condiciones empleadas en el experimento.

El documento WO2008/031020 A2 divulga un método para producir un anticuerpo monoclonal purificado usando una matriz de Proteína A a la que se une el anticuerpo, comprendiendo el método lavar la matriz con una solución de lavado que comprende arginina a un pH de 4.5 a aproximadamente 8.0 (en los ejemplos pH es 7.5), en donde el lavado se realiza sin la presencia de una sal no reguladora. Existe una necesidad desde hace mucho tiempo de técnicas mejoradas para mejorar el proceso de purificación y aumentar la recuperación del producto. La presente divulgación aborda esta necesidad y proporciona beneficios adicionales.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona una solución de lavado eficiente y robusta para la cromatografía de afinidad, así como métodos de lavado utilizando esta solución. Esta solución de lavado se aplica en un paso de lavado antes del paso

de elución, y su uso efectivamente remueve las especies de bajo peso molecular (LMWs), las especies de alto peso molecular (HMWs), y las proteínas de células huésped (HCPs) a partir del material de partida aplicado a la matriz, mientras que da como resultado altos rendimientos de la proteína de interés eluida desde la matriz de afinidad. Esta solución de lavado se caracteriza por la presencia de arginina a un alto pH, es decir, por arriba de 8.0, sin la presencia de una sal no reguladora del pH. Esta combinación de arginina (o un derivado de arginina) a un alto pH remueve significativamente más impurezas que las soluciones de lavado que contienen arginina a un pH más bajo, y da como resultado un pico de elución más agudo que se correlaciona con una alta concentración de la proteína de interés recuperada.

De conformidad con lo anterior, en una realización, la invención proporciona un método para la producción de una proteína de interés purificada (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína), utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (AC) con la que se enlaza la proteína de interés, comprendiendo el método lavar la matriz de cromatografía de afinidad (AC) con una solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, a un pH de más de 8.0, sin la presencia de una sal no reguladora del pH. En una realización preferida, el pH de la solución de lavado es de cuando menos 8.1, más preferiblemente de cuando menos 8.5, y todavía más preferiblemente de cuando menos 8.9 o 9.0. En una realización, el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 8.5 a 9.5. En otra realización, el pH de la solución de lavado es de aproximadamente 8.9 a 9.0.

En otra realización, el método comprende además: (a) cargar una mezcla que comprende la proteína de interés sobre la matriz de cromatografía de afinidad (AF), (b) lavar la matriz de cromatografía de afinidad (AC) con una solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, a un pH mayor de 8.0; y (c) eluir la proteína de interés a partir de la matriz de cromatografía de afinidad (AC), en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora del pH.

En una realización particular, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) es una columna de proteína A. En otras diversas realizaciones, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) se selecciona a partir del grupo que consiste en una columna de proteína G, una columna de proteína A/G, una columna de proteína L, una columna de cromatografía de afinidad con ion de metal inmovilizado (IMAC), una columna de resina de calmodulina, una columna de MEP HiperCel^{MR}, una columna que se enlaza con la proteína de enlace de maltosa (MBP), una columna que se enlaza a glutatona-S-transferasa (GST), una columna que se enlaza a la Marca-Strep II, y una columna de afinidad de tinte. En otras realizaciones, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) comprende una resina seleccionada a partir del grupo que consiste en CaptureSelect IgG-CH1, CaptureSelect IgG-Fc (Hu), CaptureSelect LC-kappa (Hu), CaptureSelect LC-lambda (Hu), CaptureSelect IgG4 (Hu), CaptureSelect IgG1 (Hu), CaptureSelect IgG3 (Hu), CaptureSelect IgM y CaptureSelect IgA. En otras realizaciones, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) comprende una resina seleccionada a partir del grupo que consiste en IgSelect, KappaSelect, LamdaFabSelect, y Cpto L.

Las proteínas de interés adecuadas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (y otras proteínas que comprenden regiones Fc, tales como proteínas de fusión de Fc), y fragmentos de anticuerpos, aunque también son adecuadas otras proteínas que se enlazan a las matrices de afinidad descritas en la presente para la purificación de acuerdo con los métodos de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo purificado, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprende una región Fc (por ejemplo, una proteína de fusión de Fc), utilizando una columna de proteína A, comprendiendo el método: (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína, sobre la columna de proteína A; (b) lavar la columna de proteína A con una solución de lavado que comprende: (i) arginina, o un derivado de arginina, a un pH de más de 8.0 (por ejemplo, de aproximadamente 8.5 a 9.5 o de aproximadamente 8.9 a 9.0); y (c) eluir el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína, a partir de la columna de proteína A, en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora del pH.

En todavía otro aspecto, el método opcionalmente incluye equilibrar la columna de proteína A antes de cargar y/o eluir la proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprende una región Fc (por ejemplo, una proteína de fusión de Fc)) a partir de la columna de proteína A. Por ejemplo, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo purificado, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprende una región Fc (por ejemplo, una proteína de fusión de Fc), utilizando una columna de proteína A, comprendiendo el método: (a) equilibrar la columna de proteína A (por ejemplo, utilizando un regulador de equilibrio, para ajustar el pH y eliminar cualquier regulador de almacenamiento residual); (b) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína sobre la columna de proteína A; (c) lavar la columna de proteína A con una solución de lavado que comprende: (i) arginina, o un derivado de arginina, a un pH de más de 8.0 (por ejemplo, de aproximadamente 8.5 a 9.5 o de aproximadamente 8.9 a 9.0); y (d) eluir el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína a partir de la columna de proteína A, en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora del pH. El método puede comprender además el paso de equilibrar la columna de proteína A antes de eluir el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína.

En una realización particular, la solución de lavado comprende arginina o arginina-HCl, de preferencia en una concentración en un intervalo de aproximadamente 0.1 a 0.5 M. En otra realización particular, la arginina o la

arginina-HCl está presente en una concentración de 0.25 M o de aproximadamente 0.25 M. En todavía otras realizaciones particulares, la solución de lavado comprende un derivado de arginina, tal como un derivado seleccionado a partir del grupo que consiste en acetil-arginina, N-alfa-butiroil-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina.

- 5 El método de la invención es efectivo para eliminar una variedad de impurezas, incluyendo especies de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW, respectivamente), y las proteínas de células huésped (HCPs). En una realización particular, la solución de lavado comprende además una o más sales reguladoras del pH (por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio, o Tris).

Descripción detallada de la invención

- 10 La invención proporciona una solución de lavado mejorada para cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de proteína A, la cual se aplica a la columna antes de la elución de la proteína de interés para eliminar las impurezas. La solución de lavado mejorada comprende arginina, o un derivado de arginina, a un pH de más de 8.0 (por ejemplo, a un pH de más de 8.1, de preferencia a un pH de más de 8.5, por ejemplo, entre aproximadamente 8.5 y 9.5 o entre aproximadamente 8.9 y 9.0), sin la presencia de una sal no reguladora del pH. Típicamente, la
15 solución de lavado es una solución acuosa.

- Esta combinación única de arginina, o un derivado de arginina, a un alto pH, remueve significativamente más impurezas que los procedimientos comúnmente empleados, sin afectar a la recuperación. En adición, esta condición de lavado da como resultado un pico de elución más agudo que se correlaciona con una concentración más alta de la proteína de interés en el eluato, lo cual es conveniente para aumentar el desempeño de los procesos de
20 purificación adicionales corriente abajo.

- La eliminación eficiente de impurezas, incluyendo las proteínas de células huésped (HCPs), y las impurezas relacionadas con el producto, tales como las especies de alto peso molecular (HMW) y las especies de bajo peso molecular (LMW), es un factor crucial durante el procesamiento corriente abajo de una proteína de interés. La cromatografía de afinidad se utiliza con frecuencia como la primera etapa de un proceso de purificación de múltiples
25 etapas para una proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo), y la pureza de la proteína de interés después de la cromatografía de afinidad notoriamente tiene influencia sobre la clase y el número de los siguientes pasos de purificación. Otra función importante para la cromatografía de afinidad es para concentrar el producto, lo cual permite el uso de columnas y depósitos (bolsas o tanques de acero) proporcionalmente más pequeños y menos costosos en los siguientes pasos de purificación. Por consiguiente, es particularmente importante optimizar la eliminación de
30 impurezas durante el paso de cromatografía de afinidad, mientras que se mantenga una alta concentración del intermediario y sin comprometer el rendimiento.

- Dependiendo de la matriz, las condiciones de bajo pH, típicamente entre un pH de 3 a 4, son un requisito para eluir la proteína de interés enlazada desde la matriz de afinidad, y tienen el inconveniente de inducir potencialmente la aglomeración. Históricamente, se han utilizado condiciones menos restrictivas, tales como un pH de 5 a 5.5, para
35 lavar las impurezas no específicamente enlazadas a partir de la columna, mientras que se conserve la interacción entre la proteína de interés y la matriz de afinidad. La recuperación de la proteína de interés, sin embargo, con frecuencia disminuye debido a la elución parcial de la proteína de interés en estas condiciones, en especial cuando se trabajó con altas densidades de carga. De conformidad con lo anterior, en una realización preferida, la solución de lavado proporcionada por la presente invención se procesa convenientemente a un pH de más de 8.0 (por
40 ejemplo, de preferencia a un pH de más de 8.1, más preferiblemente, a un pH de más de 8.5, por ejemplo, entre aproximadamente 8.5 y 9.5, o entre aproximadamente 8.9 y 9.0), lo cual conserva el enlace de la proteína de interés a la matriz de afinidad, mientras que permite la eliminación de impurezas.

- Típicamente, los lavados de arginina incluyen sales no reguladoras del pH. Sin embargo, una ventaja de la presente invención es que el paso de lavado empleado en la invención no requiere de la presencia de una sal no reguladora
45 del pH. Como se utiliza en la presente, el término "sal no reguladora del pH" se refiere a una sal que es de un tipo, y que está en una concentración, tales que sustancialmente no contribuyen a que se conserve el pH de una solución de lavado bajo las condiciones aplicadas (tales como un alto pH) después de la adición de ácido o de base. Las sales no reguladoras del pH incluyen sales iónicas, sales de halógeno, incluyendo aquéllas que comprenden Cl o Br y, en particular, sales de halógeno que comprenden metales alcalinos o metales alcalinotérreos, incluyendo sodio
50 (Na), potasio (K), calcio (Ca), o magnesio (Mg), sodio (Na) o potasio (K) (es decir, NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂). En una realización particular, el lavado se lleva a cabo sin la presencia de NaCl.

- El término "sal no reguladora del pH" no incluye las sales reguladoras del pH, tales como acetato de sodio, fosfato de sodio y Tris, que sustancialmente sí contribuyen a conservar el pH de una solución de lavado, bajo las
55 condiciones aplicadas. De conformidad con lo anterior, estas sales reguladoras del pH se pueden incluir en las soluciones de lavado de la invención.

La gran diversidad biofísica de las impurezas presentes en las cosechas comunes o en los extractos celulares, da como resultado muy diversos modos de interacciones con la fase sólida del medio de la cromatografía y/o de la proteína de interés enlazada. La adhesión más o menos fuerte de las impurezas puede ser el resultado de las

interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas, tales como enlace de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals, o una combinación de los mismos tipos de interacciones. Por consiguiente, se ha descubierto que una combinación de varios mecanismos diferentes (es decir, arginina, o un derivado de arginina, en combinación con un pH mayor de 8.0) es más efectiva para eliminar las impurezas que las técnicas tradicionales.

En el contexto del uso de arginina en una solución de lavado, se ha reportado que la arginina tiene la capacidad para solubilizar ciertas proteínas precipitadas (Umetsu, M. et al. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 189-197; Tsumoto, K. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 1383-1386), para reducir la formación de aglomerados (Arakawa, T. et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 148-152), y para reducir la adsorción no específica de las proteínas a las superficies (Ejima, D. et al. (2005) *J. Chromatogr. A.* 1094: 49-55). Aunque no pretendemos limitarnos por el mecanismo, la reducción de la acumulación de proteína se puede originar a partir del enmascaramiento de los parches hidrofóbicos sobre las proteínas, los cuales interactúan con la arginina. Esta interacción puede tener lugar entre el grupo guanidinio sobre la arginina y los grupos triptófano sobre las proteínas, o a través de la formación de un parche hidrofóbico mediante la acumulación de arginina, o puede ser una combinación de tales efectos.

Como se utiliza en la presente, la expresión "alto pH" se refiere a un pH de más de 8.0, el cual da como resultado una reducción significativa de impurezas comparándose con un lavado que contenga arginina o un derivado de arginina a un pH bajo o neutro (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5.0 a 7.0), como se emplea en los métodos de lavado anteriores. Por ejemplo, en una realización, el lavado a un "alto pH" da como resultado una reducción de proteínas de células huésped (HCPs) de cuando menos aproximadamente 2 a 3 veces, y/o una reducción de los niveles de especies de bajo peso molecular (LMW) de cuando menos aproximadamente 3 a 4 veces, y/o una reducción global en la aglomeración de cuando menos aproximadamente el 30 al 50 % o más, comparándose con una solución de lavado que contenga arginina a un pH bajo o neutro de 7.0.

En las realizaciones particulares, el "alto" pH de la solución de lavado es de cuando menos aproximadamente 8.1, de preferencia de cuando menos aproximadamente 8.5, y de una manera muy preferible de aproximadamente 8.5 a 9.5, o de aproximadamente 8.9 a 9.0. Las condiciones de lavado a un "alto" pH de ejemplo incluyen, por ejemplo, valores de pH de 8.1 o de aproximadamente 8.1, 8.2 o de aproximadamente 8.2, 8.3 o de aproximadamente 8.3, 8.4 o de aproximadamente 8.4, 8.5 o de aproximadamente 8.5, 8.6 o de aproximadamente 8.6, 8.7 o de aproximadamente 8.7, 8.8 o de aproximadamente 8.8, 8.9 o de aproximadamente 8.9, 9.0 o de aproximadamente 9.0, 9.1 o de aproximadamente 9.1, 9.2 o de aproximadamente 9.2, 9.3 o de aproximadamente 9.3, 9.4 o de aproximadamente 9.4, 9.5 o de aproximadamente 9.5, 10.0 o de aproximadamente 10.0, 10.1 o de aproximadamente 10.1, 10.2 o de aproximadamente 10.2, 10.3 o de aproximadamente 10.3, 10.4 o de aproximadamente 10.4 y 10.5, o de aproximadamente 10.5. La solución de lavado también puede contener uno o más reguladores (es decir, sales reguladoras del pH) para ajustar y/o mantener el pH. Los ejemplos no limitantes de los reguladores típicos que se pueden incluir en las soluciones de lavado incluyen Tris (tris-(hidroxi-metil)-metilamina), bis-tris, bis-tris propano, histidina, trietanolamina, dietanolamina, formato, acetato, MES (ácido 2-(N-morfolino)-etan-sulfónico), fosfato, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etan-sulfónico), citrato, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propan-sulfónico), TAPS (ácido 3-[[tris-(hidroxi-metil)-metil]-amino]-propan-sulfónico), Bicina (N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-glicina), Tricina (N-tris-(hidroxi-metil)-metil-glicina), TES (ácido 2-[[tris-(hidroxi-metil)-metil]-amino]-etan-sulfónico), PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis-(2-etan-sulfónico), cacodilato (ácido dimetil-arsínico), y SSC (citrato de sodio salino).

El método de purificación de la invención es efectivo para eliminar una variedad de impurezas, incluyendo especies de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW, respectivamente) y las proteínas de células huésped (HCPs). Como se describe con detalle en los Ejemplos, el método es efectivo para reducir las especies de alto peso molecular (HMW), las especies de bajo peso molecular (LMW), y las proteínas de células huésped (HCPs) en el eluato de lavado, mientras que se alcanza un alto porcentaje de rendimiento de la proteína de interés, y una alta concentración de la proteína de interés. Por ejemplo, en diferentes realizaciones, el método descrito en la presente da como resultado un porcentaje de rendimiento de la proteína de interés que es mayor del 97 %, más preferiblemente mayor del 98 %, y muy preferiblemente mayor del 99 %.

En otras realizaciones, el método de la invención da como resultado un porcentaje de reducción en los contaminantes de alto peso molecular (HMW) o de bajo peso molecular (LMW) en el eluato que es una reducción de cuando menos aproximadamente 2 veces, más preferiblemente una reducción de cuando menos aproximadamente 3 veces, más preferiblemente una reducción de cuando menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente una reducción de cuando menos aproximadamente 5 veces, y todavía más preferiblemente una reducción de cuando menos aproximadamente 6 veces. En todavía otras realizaciones, el método da como resultado un valor de reducción logarítmico (LRV) de proteínas de células huésped (HCPs) en el eluato de cuando menos aproximadamente 1.1, o de cuando menos aproximadamente 1.2, o de cuando menos aproximadamente 1.3, o de cuando menos aproximadamente 1.4, o de cuando menos aproximadamente 1.5, o de cuando menos aproximadamente 1.6, o de cuando menos aproximadamente 1.7, o de cuando menos aproximadamente 1.8, o de cuando menos aproximadamente 1.9, o de cuando menos aproximadamente 2.0, o de cuando menos aproximadamente 2.1, o de cuando menos aproximadamente 2.2, o de cuando menos aproximadamente 2.3, o de cuando menos aproximadamente 2.4, o de cuando menos aproximadamente 2.5, o de cuando menos

aproximadamente 2.6, o de cuando menos aproximadamente 2.7, o de cuando menos aproximadamente 2.8, o de cuando menos aproximadamente 2.9, o de cuando menos aproximadamente 3.0.

5 Aunque no se pretende estar limitado por el mecanismo, un alto pH puede desnaturalizar parcialmente las proteínas de células huésped (HCPs) y las especies de alto peso molecular (HMWs), mientras que las proteínas estables, incluyendo los anticuerpos monoméricos, no son influenciadas en estas condiciones. La desnaturalización de las proteínas contaminantes se puede manifestar como un ligero cambio en la estructura, el cual puede ser suficiente para debilitar el enlace no específico. Por consiguiente, el alto pH de la solución de lavado puede ser benéfico para aumentar la eliminación de impurezas mediante la desestabilización de su interacción con la proteína de interés enlazada o con el soporte sólido de la matriz de afinidad.

10 De conformidad con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona un método para la producción de una proteína purificada (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprende una región Fc (por ejemplo, una proteína de fusión de Fc)), utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (AC) con la que se enlaza la proteína de interés, comprendiendo el método lavar la matriz de cromatografía de afinidad (AC) con una solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, a un alto pH de más de 8.0 (por ejemplo, de preferencia a un pH de más de 8.1, más preferiblemente, a un pH de más de 8.5, por ejemplo, entre 15 aproximadamente 8.5 y 9.5, o entre aproximadamente 8.9 y 9.0), sin la presencia de una sal no reguladora del pH, antes de la elución de la proteína de interés a partir de la matriz de cromatografía de afinidad (AC). La matriz de cromatografía de afinidad (AC) opcionalmente puede ser equilibrada antes de cargar la proteína de interés y/o antes de eluir la proteína de interés.

20 Como se utiliza en la presente, el término "matriz de cromatografía de afinidad" o "matriz AC", pretende referirse a un medio en fase sólida, típicamente a un gel o a una resina, que permite la separación de las mezclas bioquímicas basadas en una interacción de enlace altamente específico entre una proteína de interés y la matriz de cromatografía de afinidad (AC), tal como entre un receptor y un ligando, una enzima y un sustrato, o un antígeno y un anticuerpo. Por consiguiente, el medio en fase sólida comprende un objetivo al que se puede fijar la proteína de 25 interés de una manera reversible, dependiendo de las condiciones del regulador. Los ejemplos no limitantes de medios inmovilizados o en fase sólida que pueden comprender a la matriz de cromatografía de afinidad (AC) incluyen una matriz de gel, tal como esferas de agarosa (tales como las matrices Sepharose comercialmente disponibles), y una matriz de vidrio, tal como gránulos de vidrio porosos (tales como las matrices ProSep comercialmente disponibles).

30 El enlace de la proteína de interés a la matriz de cromatografía de afinidad (AC) típicamente se logra mediante la cromatografía en columna. Es decir, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) se forma en una columna, se hace fluir una mezcla bioquímica que contenga una proteína de interés a través de la columna, seguido por el lavado de la columna haciendo fluir a través de la columna una solución de lavado, seguido por la elución de la proteína de interés a partir de la columna haciendo fluir a través de la columna un regulador de elución.

35 De una manera alternativa, el enlace de la proteína de interés a la matriz de cromatografía de afinidad (AC) se puede lograr mediante su tratamiento por lotes, en donde las mezclas bioquímicas que contienen la proteína de interés se incuban con la matriz de cromatografía de afinidad (AC) en un recipiente para permitir el enlace de la proteína de interés a la matriz de cromatografía de afinidad (AC), se remueve el medio en fase sólida del recipiente (por ejemplo, mediante centrifugación o filtración utilizando una bomba de vacío), se lava el medio en fase sólida 40 para eliminar las impurezas, y nuevamente se recupera (por ejemplo, mediante centrifugación o filtración utilizando una bomba de vacío), y se eluye la proteína de interés a partir del medio en fase sólida.

45 En todavía otra realización, se puede utilizar una combinación de tratamiento por lotes y cromatografía en columna. Por ejemplo, el enlace inicial de la proteína de interés a la matriz de cromatografía de afinidad (AC) se puede lograr mediante el tratamiento por lotes, y entonces el medio en fase sólida se puede empacar en una columna, siguiendo el lavado de la columna y la elución de la proteína de interés a partir de la columna.

50 La naturaleza de una matriz en fase sólida particular, en particular, las propiedades de enlace del objetivo adherido a la fase sólida, determina los tipos de proteínas que se pueden purificar utilizando esa matriz en fase sólida. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la matriz de cromatografía de afinidad (AC) es una columna de proteína A, que comprende, como el objetivo adherido a la fase sólida, una proteína de pared celular bacteriana, la Proteína A, que se enlaza específicamente a los dominios CH2 y CH3 dentro de la región Fc de ciertas inmunoglobulinas. Las propiedades de enlace de la proteína A están bien establecidas en la materia.

55 De conformidad con lo anterior, en una realización preferida de la invención, la proteína de interés (que se va a purificar) es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprende una región Fc (por ejemplo, una proteína de fusión de Fc). Adicionalmente, las proteínas adicionales que se pueden purificar utilizando cromatografía de proteína A incluyen las proteínas que contienen Fc (por ejemplo, las proteínas de fusión de Fc). Hasta donde cualquier proteína sea capaz de enlazarse específicamente a una proteína una matriz, se puede purificar de acuerdo con los métodos de la invención. Varias resinas de Proteína A son bien conocidas en la materia y son adecuadas para utilizarse en la invención. Los ejemplos no limitantes de las resinas de proteína A comercialmente disponibles incluyen MabSelect, MabSelect Xtra, MabSelect Sure, rProteína A Sepharose FF, rmpProteína A Sepharose FF,

5 Proteína A Sepharose CL-4B, y nProteína A Sepharose 4 FF (todas comercialmente disponibles en GE Healthcare); ProSep A, ProSep-vA de Alta Capacidad, ProSep-vA Ultra y ProSep-Va Ultra Plus (todas comercialmente disponibles en Millipore); Poros A y Mabcapture A (ambas comercialmente disponibles en Poros); IPA-300, IPA-400 e IPA-500 (todas comercialmente disponibles en RepliGen Corp.); Proteína A Affigel y Proteína A Affiprep (ambas comercialmente disponibles en Bio-Rad); Proteína A Ceramic Hiper D F (comercialmente disponible en Pall Corporation); Proteína A Ultralink Immobilized y Proteína A de Agarosa (ambas comercialmente disponibles en PIERCE); y Proteína A Cellthru 300 y Proteína A Ultraflow (ambas comercialmente disponibles en Sterogen Bioseparations).

10 En otra realización, la resina es CaptureSelect IgG-CH1 (adecuada para la purificación de la IgG humana y de todos los fragmentos Fab), CaptureSelect IgG-Fc (Hu) (específica para la IgG humana, que reconoce las cuatro subclases), CaptureSelect LC-kappa (Hu) (adecuada para la purificación de todos los productos que contengan cadena ligera de Ig Lambda humana (anteriormente conocida como CaptureSelect Fab kappa)), CaptureSelect LC-lambda (Hu) (adecuada para la purificación de todos los productos que contengan cadena ligera de Ig Lambda humana (anteriormente conocida como CaptureSelect Fab lambda)), CaptureSelect IgG4 (Hu) (altamente específica para la IgG4 humana sin enlazarse cruzadamente con otras subclases o especies), CaptureSelect IgG1 (Hu) (altamente específica para la IgG1 humana sin enlazarse cruzadamente con otras subclases o especies), CaptureSelect IgG3 (Hu) (altamente específica para la IgG3 humana sin enlazarse cruzadamente con otras subclases o especies), CaptureSelect IgM (resina de IgM adecuada para IgM humana, de ratón, y de rata), o CaptureSelect IgA (adecuada para la purificación de IgA humana, dímeros de IgA, e IgA secretora (sIgA)), todas las cuales están comercialmente disponibles en BAC. En otra realización, la resina es IgSelect (un medio de afinidad para la purificación de la IgG humana), KappaSelect (un medio de afinidad para la purificación de fragmentos Fab (kappa)), LamdaFabSelect (un medio de afinidad para la purificación de fragmentos Fab lambda), o Capto L (una resina para capturar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos), todas las cuales están comercialmente disponibles en GE Healthcare Life Sciences.

25 Otros sistemas de cromatografía de afinidad que se pueden emplear en la invención incluyen, por ejemplo, columnas de Proteína G, Proteína A/G, y Proteína L, cada una de las cuales son también proteínas bacterianas que se enlazan a la inmunoglobulina, con propiedades de enlace establecidas en la materia. Por consiguiente, se puede utilizar una matriz de cromatografía de afinidad (AC) que sea una matriz de proteína G, una matriz de proteína A/G, o una matriz de proteína L, para purificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o proteínas que comprendan una región Fc (por ejemplo, proteínas de fusión de Fc).

30 Otros ejemplos de matrices de cromatografía de afinidad (AC), y los tipos de proteínas que son efectivos para la purificación incluyen los siguientes: una columna de cromatografía de afinidad de ion de metal inmovilizado (IMAC) (para la purificación de las proteínas con una afinidad por los iones de metales, tales como las proteínas marcadas con histidina), una columna de resina de calmodulina (para la purificación de las proteínas marcadas con un péptido que se enlace a calmodulina (CBP)), una columna MEP HiperCel^{MR} (una matriz de celulosa que se enlaza selectivamente a la inmunoglobulina), una columna que se enlaza a la proteína de enlace de maltosa (MBP) (tal como una resina de Dextrina Sepharose^{MR} que se enlaza selectivamente a las proteínas marcadas con MBP), una columna que se enlaza a glutationa-S-transferasa (GST) (tal como una resina de Glutationa Sepharose^{MR} que se enlaza selectivamente a las proteínas marcadas con GST), y una columna que se enlaza a Strep-Tag II (tal como una resina de Strep-Tactin^{MR} Sepharose que se enlaza selectivamente a las proteínas marcadas con Strep-Tag II). Adicionalmente, se pueden utilizar matrices de inunoafinidad, que comprenden un anticuerpo como el objetivo fijado a la fase sólida, para purificar un antígeno de interés que se enlace específicamente a un anticuerpo fijado a la fase sólida.

45 Aunque la invención de interés se describe en la presente en particular con respecto a la purificación de anticuerpos utilizando cromatografía de proteína A, hasta donde se sepa en la técnica que cualquier proteína (incluyendo las proteínas de fusión) se enlaza selectivamente a una matriz de cromatografía de afinidad (AC) particular, la proteína es susceptible a la purificación empleando los métodos de lavado descritos en la presente.

50 Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de enlace al antígeno (es decir, "los fragmentos de enlace al antígeno" (también conocidos como "porciones de enlace al antígeno")) o cadenas individuales de los mismos. Los anticuerpos enteros son glicoproteínas que comprenden cuando menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H), y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L), y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas como regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas como regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y cuatro regiones de estructura (FRs), arregladas desde el término amino hasta el término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del

huésped, incluyendo las diversas células del sistema inmunológico (por ejemplo, las células efectoras), y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" también abarca las formas multiméricas de anticuerpos, tales como minicuerpos, bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y los multímeros Fab' químicamente conjugados.

5 El término "fragmento de anticuerpo" (también referido como "fragmento de enlace al antígeno" o "porción de enlace al antígeno"), como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para enlazarse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de enlace al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de enlace abarcados dentro del término "fragmento de enlace al antígeno" de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂; un fragmento bivalente es esencialmente un Fab con parte de la región de articulación (véase Fundamental Immunology (Paul, Editor, 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546), el cual consiste en un dominio VH; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo (también conocido como un anticuerpo de un solo dominio (sdAb)), el cual es una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Los anticuerpos de un solo dominio incluyen fragmentos VHH (anticuerpos de un solo dominio diseñados a partir de los anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en los camélidos), así como fragmentos VNAR (anticuerpos de un solo dominio obtenidos a partir de los anticuerpos de cadena pesada (IgNAR, 'nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina') de peces cartilaginosos).

Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, empleando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les haga posible hacerse como una sola cadena de proteína en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85: 5879-5883). Se pretende que estos anticuerpos de una sola cadena también sean abarcados dentro del término "fragmento de enlace al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen empleando técnicas convencionales conocidas por aquéllos con experiencia en la materia, y los fragmentos se rastrean para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las moléculas quiméricas (o moléculas de fusión) que comprenden un dominio de enlace al antígeno, o su equivalente, fusionado con otro polipéptido o molécula, también están abarcados por la presente invención.

Las soluciones de lavado de la invención comprenden arginina o un derivado de arginina. La arginina, la cual se puede utilizar en la presente invención, puede ser el aminoácido natural de arginina (por ejemplo, L-arginina), D-arginina, o un derivado de arginina. Como se utiliza en la presente, el término "derivado de arginina" se refiere a las moléculas derivadas a partir del aminoácido de arginina, ya sea de la forma D o L, mediante procesos químicos o físicos que conserven cualquiera de las propiedades zwitteriónicas, anfipróticas, o dipolares de la arginina (por ejemplo, que puedan romper las interacciones no específicas entre las impurezas enlazadas a la estructura base de la resina, al ligando de la proteína A, o a la proteína objetivo enlazada). Los derivados de arginina de acuerdo con la invención son moléculas seleccionadas del grupo que consisten de arginina acilada, tal como acetil-arginina y N-alfa-butiroil-arginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloil-arginina. La arginina o el derivado de arginina se puede utilizar en la forma de una sal de adición de ácido. Los ejemplos de los ácidos que pueden formar una sal de adición de ácido incluyen ácido clorhídrico y similares. Otros derivados divulgados aquí son ácido 3-guanidino-propiónico, ácido 4-guanidino-butírico ácido, clorhidrato de ácido L-2-amino-3-guanidino-propiónico, clorhidrato de ácido L-2-amino-3-guanidino-propiónico, sal de *p*-toluen-sulfonato de bencil-éster de N_ω-Nitro-L-arginina, y homoarginina.

La concentración de arginina o del derivado de arginina en la solución de lavado típicamente es de entre 0.05 y 0.85 M (la cual es la solubilidad superior de la arginina en agua a 20°C) (por ejemplo, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M, 0.5 M, 0.55 M, 0.6 M, 0.65 M, 0.7 M, 0.75 M, 0.8 M o 0.85 M), más preferiblemente de entre 0.1 y 0.5 M (por ejemplo, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M o 0.5 M). En diferentes realizaciones, la concentración de arginina o del derivado de arginina puede ser, por ejemplo, de 0.05 M, 0.1 M, 0.2M, 0.25M, 0.3M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7M o 0.8M, o de entre 0.1 M y 0.5 M. En ciertas realizaciones, la concentración de arginina o del derivado de arginina en la solución de lavado es de 0.25 M o mayor. En las realizaciones particulares, la arginina está presente en una concentración de 0.1 M, o de aproximadamente 0.1 M, 0.25 M, o de aproximadamente 0.25 M, o 0.5 M, o de aproximadamente 0.5 M.

55 Aunque la invención se describe en la presente con respecto a un paso de lavado durante la cromatografía de afinidad, será fácilmente evidente para la persona con experiencia normal que se llevan a cabo pasos adicionales tanto antes como después del paso de lavado para lograr la purificación de la proteína de interés a partir de la matriz de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, antes del paso de lavado y/o de elución, los métodos de la invención pueden incluir un paso de equilibrio, en donde la matriz de cromatografía de afinidad se equilibra, y/o un paso de carga o captura, en donde se aplica una mezcla bioquímica (por ejemplo, la cosecha celular) que contenga la proteína de interés a la matriz de cromatografía de afinidad (AC).

Los reguladores de equilibrio adecuados tienen en general un pH aproximadamente neutro para coincidir con la solución de carga (aproximadamente 7.0 +/- 0.5), con el objeto de impedir la precipitación. Usualmente no tiene que contener la sal (NaCl), sino solamente un regulador (fosfato para este intervalo de pH) en una concentración justo suficiente para regular (> aproximadamente 20 mM). Las condiciones adecuadas para el regulador de equilibrio

5

Adicionalmente, después del paso de lavado como se menciona anteriormente, los métodos de la invención pueden incluir un paso de elución, en donde se aplica un regulador de elución a la matriz de cromatografía de afinidad para eluir la proteína de interés a partir de la matriz. Las condiciones adecuadas para el regulador de elución variarán dependiendo de la naturaleza de la matriz de cromatografía de afinidad (AC) y de la proteína de interés que se vaya a purificar, y la persona con experiencia normal puede determinar fácilmente estas condiciones utilizando los métodos y la información bien establecidos en la materia. Típicamente, la elución de la proteína de interés a partir de

10

15

la matriz de cromatografía de afinidad (AC) se lleva a cabo a un pH ácido. Los ejemplos no limitantes de los reguladores de elución para la purificación de los anticuerpos en las columnas de proteína A se estipulan en los Ejemplos.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para eliminar impurezas a partir de mezclas que contienen anticuerpos durante la purificación con Proteína A de un anticuerpo u otra proteína que contenga Fc. De conformidad con lo anterior, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo purificado, fragmento de anticuerpo, o proteína que comprenda una región Fc, utilizando una columna de proteína A, comprendiendo el método:

20

(a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína, sobre la columna de proteína A;

25

(b) lavar la columna de proteína A con una solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, a un pH de más de 8.0 (por ejemplo, a un pH de más de 8.1, de preferencia a un pH de más de 8.5, y de una manera muy preferible entre aproximadamente 8.5 y 9.5, o entre aproximadamente 8.9 y 9.0); y

30

(c) eluir el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína a partir de la columna de proteína A, en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora del pH. Opcionalmente, el método comprende además lavar la columna de proteína A con un regulador de equilibrio antes de eluir el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, a partir de la columna de proteína A. Opcionalmente, el método puede comprender además equilibrar la columna de proteína A antes de cargar la proteína de interés y/o antes de eluir la proteína de interés.

35

Las concentraciones y los intervalos de concentración preferidos para la arginina (y los derivados de arginina) son como se describen anteriormente. Por ejemplo, en una realización, la arginina está en una concentración de aproximadamente 0.25 M, o en una concentración de 0.25 M. En otra realización, la arginina está en una concentración en un intervalo de 0.1 a 0.5 M. Los pHs y los intervalos de pH preferidos también son como se describen anteriormente. Por ejemplo, el pH es un pH de más de 8.0 (por ejemplo, de preferencia un pH de más de 8.1, más preferiblemente un pH de más de 8.5, por ejemplo, de entre aproximadamente 8.5 y 9.5, o de entre aproximadamente 8.9 y 9.0).

40

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Un alto pH solo no aumenta la pureza del producto.

45

En este ejemplo, se evalúa el efecto del pH solo sobre la eliminación de las impurezas a partir de una solución que contiene anticuerpo durante la cromatografía de afinidad. De una manera específica, se comparan dos soluciones de lavado: una que contiene NaCl 1 M a un pH de 7.0, y una que contiene NaCl 1 M a un pH de 9.0.

Los sobrenadantes del cultivo celular de mamífero aclarados que contienen entre 0.2 y 3.0 gramos/litro del anticuerpo monoclonal #1 se cosechan mediante filtración profunda, y se purifican utilizando una columna de ALC, en particular una columna de proteína A (GE Healthcare), de acuerdo con las condiciones descritas a continuación en la Tabla 1:

50

Tabla 1: Condiciones de operación para la columna de proteína A, para el Ejemplo 1

Paso	Regulador	CV	RST*(min)	Comentario
Equilibrio	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20mM, pH de 7.0	5	4	Recolección Pico (280 nm): 100 – 100 mAU
Carga	Cosecha sin células **	c.s.	4	
Lavado 1	Variable (Véase la Tabla 2)	6	4	
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20mM, pH de 7.0	3	4	
Elución	ácido acético 20 mM	5	4	
CIP	NaOH 0.1 M	4	4	
Almacenamiento	Ácido acético/acetato de sodio 20 mM, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	5	4	

* RST, tiempo de residencia; ** Densidad de carga: de acuerdo con la capacidad de enlace dinámico previamente determinada: 36 gramos de anticuerpo por litro de resina.

La columna equilibrada se carga con la cosecha aclarada y primero se lava con cualquiera de W1-N7 (NaCl 1 M a un pH de 7.0) o W2-N9 (NaCl 1 M a un pH de 9.0), como se describe en la Tabla 2 a continuación:

5

Tabla 2: Lista de las soluciones de lavado probadas

Número	Regulador	Abreviatura del regulador
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20mM, NaCl 1 M, pH 7.0	W1-N7
2	NaH ₂ -/Na ₂ H-PO ₄ /NaOH 20mM, NaCl 1M, pH 9.0 *	W2-N9

*, pH ajustado con Tris 1 M.

La columna se lava luego con regulador de equilibrio como se describe en la Tabla 1 (es decir, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM, pH de 7.0), y entonces se eluye a un pH bajo. El eluato se analiza para determinar su concentración de anticuerpo mediante ALC analítica, para las especies de alto peso molecular/bajo peso molecular (HMW/LMW) mediante cromatografía analítica de exclusión de tamaños (SEC), y para el contenido de proteínas de células huésped (HCPs) mediante análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas, desarrollados sobre la misma línea celular.

10

El porcentaje de rendimiento para la purificación con proteína A del anticuerpo monoclonal #1 utilizando las dos diferentes soluciones de lavado mostradas en la Tabla 2, se muestra a continuación en la Tabla 3.

15

Tabla 3: Comparación del efecto de un bajo y alto pH sobre el rendimiento de la ALC

Prueba	Rendimiento* (%)	Conc. (mg/ml)	HMW (%)	LMW (%)	HCP (ppm)
Carga (cosecha aclarada)		2.32			370962
W1-N7	100.8	20.00	1.3	0.4	9315
W2-N9	101.9	20.28	1.2	0.5	8984

* Carga en mililitros → Eluato en gramos.

5 Como se muestra en la Tabla 3, la variación del pH desde neutro (pH de 7.0) hasta básico (pH de 9.0) no tiene efecto alguno sobre el rendimiento, la concentración de reserva de eluato, los niveles de las especies de alto peso molecular (HMW) o de bajo peso molecular (LMW), o la concentración de proteínas de células huésped (HCPs). Como tales, estos resultados demuestran que un alto pH solo no da como resultado un aumento en la pureza del producto. Sin embargo, como se demuestra en los siguientes ejemplos, un alto pH en combinación con arginina tiene un efecto significativo sobre la pureza del producto.

Ejemplo 2: Arginina (en combinación con un alto pH) es un excipiente crucial.

10 En este ejemplo, se compara la capacidad de diversos lavados para determinar cuál lavado y pH es el más efectivo para eliminar las impurezas a partir de una solución que contiene anticuerpo durante la cromatografía de afinidad. De una manera específica, se comparan cuatro soluciones de lavado: una que contiene NaCl 1 M a un pH de 7.0, una que contiene arginina 250 mM a un pH de 7.0, una que contiene arginina 250 mM a un pH de 8.9, y una que contiene Tris 500 mM a un pH de 8.9. El Tris se incluye para determinar si el Tris solo tiene un efecto sobre la eliminación de las impurezas.

15 Los sobrenadantes de cultivo celular de mamífero aclarados que contienen entre 0.2 y 2.5 gramos/litro del anticuerpo monoclonal #3 se cosechan mediante filtración profunda, y se purifica utilizando una columna de ALC, en particular una columna de proteína A (GE Healthcare), de acuerdo con las condiciones descritas a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4: Condiciones de operación para la columna de proteína A, para el Ejemplo 2

Paso	Regulador	CV	RST*(min)	Comentario
Equilibrio 1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH de 7.0	3	4	
Equilibrio 2	Regulador de Lavado 1	3	4	
Carga	Cosecha sin células	c.s.	4	
Lavado 1	Variable (Véase la Tabla 5)	6 o 12	4	
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH de 7.0	3	4	
Elución	Ácido acético 50 mM	5	4	Recolección Pico (280 nm): 100 – 100 mAU
CIP	NaOH 0.1 M	3	4	
Almacenamiento	Acetato de Na 20mM, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	5	4	
* RST, tiempo de residencia; ** Densidad de carga: 30 gramos de anticuerpo por litro de resina.				

20 La columna equilibrada se carga con la cosecha aclarada y primero se lava con cualquiera de W1-N7, W3-Arg7, W4-Arg9 o W5-T9, como se describe en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5: Lista de las soluciones de lavado probadas

Número	Regulador	Abreviatura del regulador
3	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1M, pH de 7.0	W1-N7
4	L-arginina 250 mM, pH de 7.0 **	W3-Arg7
5	L-arginina 250 mM, pH de 8.9 **	W4-Arg9
6	Tris 500 mM, pH de 8.9	W5-T9

Número	Regulador	Abreviatura del regulador
**, pH ajustado con Tris 1 M.		

5 La columna luego se lava con regulador de equilibrio como se describe en la Tabla 4 (es decir, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, pH de 7.0), y entonces se eluye a un pH bajo. El eluato se analiza para determinar la concentración de anticuerpo mediante ALC analítica, las especies de alto peso molecular/bajo peso molecular (HMW/LMW) mediante cromatografía analítica de exclusión de tamaños (SEC), y el contenido de proteínas de células huésped (HCPs) mediante análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas, desarrollados sobre la misma línea celular.

El porcentaje de rendimiento para la purificación con proteína A del anticuerpo monoclonal #3 utilizando las cuatro diferentes soluciones de lavado mostradas en la Tabla 5, se muestra a continuación en la Tabla 6.

10 Tabla 6: Comparación del regulador de lavado de ALC que contiene NaCl con el regulador basado en arginina en diferentes valores de pH y regulador basado en Tris

Nombre	Rendimiento (%) *	Conc. (g/litro)	HMW (%)	LMW (%)	HCP (ppm)
Cosecha	-	1.53			>600000**
W1-N7	100.1	17.13	3.1	0.6	32000
W3-Arg7	99.1	18.94	2.3	0.4	28273
W4-Arg9	99.3	19.72	1.5	0.1	9210
W5-T9***	98.1	16.44	3	0.6	54876

* Carga en mililitros → Eluato en gramos; ** Valor de HCP no determinado exactamente; ***, El lavado se llevó a cabo para 12 CVs en lugar de 6.

15 Como se muestra en la Tabla 6, es evidente que los reguladores basados en arginina son más eficientes para eliminar las especies de alto peso molecular (HMWs), las especies de bajo peso molecular (LMWs), y las proteínas de células huésped (HCPs) que un lavado con un alto contenido de sal. Más aún, este efecto se amplifica en condiciones de un alto pH. De una manera específica, el uso de un regulador de lavado que contiene arginina a un alto pH de 8.9 (W4-Arg9), sin la presencia de una sal no reguladora del pH, da como resultado una reducción de 3 veces de las proteínas de células huésped (HCPs), una reducción de 4 veces de los niveles de especies de bajo peso molecular (LMWs), y una reducción del nivel acumulado desde el 2.3 hasta el 1.5 %, comparándose con un regulador de lavado que contiene arginina a un pH de 7.0 (W3-Arg7). A pesar de los rendimientos comparables, el pH más alto también incrementa la concentración de la reserva.

20 Debido a que se utiliza Tris para ajustar el pH en los reguladores que contienen arginina, y a que se requiere cerca de 300 mM de Tris para alcanzar un pH de 8.9, se incluye un lavado que contiene 500 mM de Tris a un alto pH (es decir, W5-T9). Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6, W5-T9 no tiene efecto alguno sobre la eliminación de las especies de alto peso molecular (HMWs) o de bajo peso molecular (LMWs). De hecho, el nivel de proteínas de células huésped (HCPs) es todavía más alto para W5-T9 que para el lavado que contiene NaCl. Dado que este lavado se lleva a cabo en condiciones del mejor caso para el Tris (por ejemplo, lo que significa casi el doble de concentración de Tris comparándose con la concentración más alta utilizada en los otros reguladores y duplicándose el tiempo de lavado), los resultados sugieren que el Tris solo no tiene efecto alguno de lavado. Adicionalmente, está claro que el alto pH solo no da como resultado la eliminación de impurezas deseada.

30 Ejemplo 3: El lavado de arginina en combinación con un alto pH reduce significativamente las impurezas.

En este ejemplo, se evalúa el efecto de tres diferentes condiciones de regulador de lavado sobre la pureza de tres anticuerpos monoclonales. De una manera específica, se comparan tres soluciones de lavado: (1) bajo pH (W6-Ace5), (2) alta sal (W1-N7), y (3) arginina a un alto pH (W7-Arg9).

35 Se cosecharon tres anticuerpos monoclonales (#1, #2, y #4) mediante filtración profunda, y se purificaron utilizando una columna de ALC, en particular una columna de proteína A (GE Healthcare), de acuerdo con las condiciones descritas a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7: Condiciones de operación para la columna de proteína A, para el Ejemplo 4

Paso	Regulador	CV	RST * (min)
Equilibrio	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7.0 (LOESL0073)	6	4
Carga	Cosecha sin células **	c.s.	4
Lavado 1	Variable (Véase la Tabla 11)	3	4
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7.0 ***	3	4
Elución	Ácido acético 20 mM	4	4
CIP	NaOH 0.1 M	3	4
Almacenamiento	Ácido acético/acetato de sodio 20 mM, Alcohol bencílico al 2%, pH 5.1	4	4

* RST, Tiempo de residencia; ** Densidad de carga: de acuerdo con la capacidad de enlace dinámico previamente determinada: 36 / 42 / 36 gramos de anticuerpo By / Qg / Bp, respectivamente, por litro de resina; ***, Paso omitido si el lavado 1 fue con acetato de sodio 20 mM, pH de 5.0.

La columna equilibrada se carga con la cosecha aclarada y primero se lava como se describe en la Tabla 8 a continuación:

5

Tabla 8: Lista de las soluciones de lavado probadas

Número	Regulador	Abreviatura de regulador
1	Acetato de Na 20 mM, pH 5.0	W6-Ace5
2	NaH ₂ -/Na ₂ H-PO ₄ 20 mM, NaCl 1 M, pH 7.0	W1-N7
3	L-arginina/L-arginina-HCl 250 mM, pH 9.0 *	W7-Arg9

*, Similar a W4-Arg9, pero ajuste del pH con L-arginina, no con Tris.

10

La columna luego se lava con regulador de equilibrio como se describe en la Tabla 7 (es decir, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM, pH de 7.0), y entonces se eluye a un pH bajo. El eluato se analiza para determinar su concentración de anticuerpo mediante ALC analítica, las especies de alto peso molecular/bajo peso molecular (HMW/LMW) mediante cromatografía analítica de exclusión de tamaños (SEC), y el contenido de proteínas de células huésped (HCPs) mediante análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas, desarrollados sobre la misma línea celular.

15

La Tabla 9 resume los efectos de diferentes condiciones del regulador de lavado de ALC sobre la pureza de tres anticuerpos monoclonales en el eluato, como se evalúa por el rendimiento del anticuerpo, las concentraciones de reserva de eluato, los niveles de proteínas de células huésped (HCPs), y los niveles de especies de alto peso molecular (HMW).

Tabla 9: Compendio de la comparación del rendimiento de la ALC después de lavar con un bajo pH (W6-Ace5), un alto contenido de sal (W1-N7), o Arginina a un alto pH (W7-Arg9) para tres Anticuerpos Monoclonales (#1, #2, y #4)

mAb	Regulador de Lavado	Rendimiento [%]	Conc. [g/L]	HCP [ppm]	HMW [%]
#1	Cosecha	NA	2.29	381238	NA
#1	W6-Ace5	84.5	16.2	35287	3.9
#1	W1-N7	100	20.0	9315	1.3
#1	W7-Arg9	98.6	19.9	10755	1.0
#4	Cosecha	NA	1.91	253087	NA
#4	W6-Ace5	92.7	19.5	17981	2.8
#4	W1-N7	97.6	19.0	14894	1.3
#4	W7-Arg9	94.1	20.7	6679	0.9
#2	Cosecha	NA	1.72	603649	NA
#2	W6-Ace5	94.8	16.1	11001	8.8
#2	W1-N7	98.5	16.4	6607	8.4
#2	W7-Arg9	98.8	13.7	1759	8.3

Las filas en negrillas representan la composición de la cosecha; Conc., Concentración del eluato; HCP, proteína de célula huésped; HMW, Especies de alto peso molecular; LRV, Valor de reducción logarítmico; NA, no aplicable.

5 Como se muestra anteriormente en la Tabla 9, el lavado con un bajo pH (W6-Ace5) da como resultado rendimientos de entre el 84.5 y el 94.8 % (promedio: 90.7 %), y el lavado con un alto contenido de sal (W1-N7) da como resultado un rendimiento promedio del 98.7 % (de entre el 97.6 y el 100 %). El lavado con arginina a un alto pH (W7-Arg9) da como resultado el rendimiento más alto de los tres lavados, con un promedio del 97.2 % de rendimiento (de entre el 94.1 y el 98.8 %).

10 Las concentraciones de eluato no muestran una tendencia clara cuando se comparan con el regulador de lavado diferente aplicado durante la ALC con los diferentes anticuerpos. Sobre todo, se encuentran intervalos comparables y ningún lavado da como resultado consistentemente la concentración más baja o más alta.

Con respecto a la eliminación de impurezas, se puede establecer un orden general entre los tres reguladores de

5 lavado. Se obtiene consistentemente la reducción más baja de proteínas de células huésped (HCPs) con el lavado a un bajo pH (W6-Ace5), seguido por el lavado con un alto contenido de sal (W1-N7). Se obtiene la eliminación más alta de impurezas con el lavado con arginina a un alto pH de 9.0 (W7-Arg9). De una manera específica, en términos del orden de eliminación logarítmico, se obtiene un promedio de 1.3 logs, después de lavar con el lavado a un bajo pH (W6-Ace5); se obtienen 1.6 logs, después de lavar con el lavado con un alto contenido de sal (W1-N7); y se logra la eliminación más alta de 1.9 logs, después de lavar con arginina en el lavado a un alto pH de 9.0 (W7-Arg9).

10 Con respecto a los niveles de las especies de alto peso molecular (HMWs), estos niveles son heterogéneos para los tres diferentes anticuerpos monoclonales, y la eliminación de las especies de alto peso molecular (HMWs) es dependiente del anticuerpo monoclonal. Sobre todo, el lavado a un bajo pH (W6-Ace5) es la solución de lavado menos efectiva para reducir los niveles de las especies de alto peso molecular (HMWs). Se obtienen mejores resultados con el lavado con un alto contenido de sal (W1-N7). Sin embargo, se encuentran consistentemente los valores más bajos de los niveles de las especies de alto peso molecular (HMWs) en el eluato de la ALC con la arginina, en un lavado con un alto pH de 9.0 (W7-Arg9). Dos anticuerpos monoclonales responden con una reducción de 3.1 o 3.9 veces en los niveles de las especies de alto peso molecular (HMWs), respectivamente, a partir del lavado a un bajo pH (W6-Ace5) comparándose con el lavado a un alto pH de 9.0 (W7-Arg9), mientras que el anticuerpo monoclonal #2 solamente muestra una reducción marginal.

20 En suma, este Ejemplo demuestra que la combinación novedosa de una arginina y un alto pH, mejora significativamente la pureza y concentración del anticuerpo comparándose con los reguladores de lavado convencionales, como se mide por el rendimiento, la concentración de reserva, el contenido de proteínas de células huésped (HCPs) de la reserva, y el bajo nivel de las especies de alto peso molecular (HMWs). El lavado con la combinación específica de arginina y un alto pH da como resultado una pureza más alta del producto y una concentración más alta del eluato, mientras que simultáneamente se minimiza la pérdida del producto. Además, la disminución en los niveles de proteínas de células huésped (HCPs) y de los niveles de las especies de alto peso molecular (HMWs) reduce la carga en los siguientes pasos de procesamiento corriente abajo, y aumenta el rendimiento global del proceso en términos de calidad y rentabilidad. Adicionalmente, debido a que cualquier contaminante tal como las proteínas de células huésped (HCPs) o las especies de alto peso molecular (HMWs) pueden servir como núcleos para la aglomeración adicional del producto, su reducción durante el paso de captura hará más lentos los procesos de aglomeración relacionados con las impurezas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de una proteína de interés purificada que utiliza una matriz de cromatografía de afinidad (AC) con la que se enlaza la proteína de interés, comprendiendo el método lavar la matriz de cromatografía de afinidad (AC) con una solución de lavado que comprende arginina o una molécula seleccionada del grupo que consiste en acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butiroil-L-arginina y N-alfa-pivaloil arginina, a un pH de más de 8.0, en donde el lavado se realiza sin la presencia de una sal no reguladora.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende:
 - a) cargar una mezcla que comprende la proteína de interés sobre la matriz de cromatografía de afinidad (AC);
 - b) lavar la matriz de cromatografía de afinidad (AC) con una solución de lavado que comprende arginina, o una molécula seleccionada del grupo que consiste en acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butiroil-L-arginina y N-alfa-pivaloil arginina, a un pH mayor de 8.0; y
 - c) eluir la proteína de interés a partir de la matriz de cromatografía de afinidad (AC),
 en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína de interés es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión de Fc.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la matriz de cromatografía de afinidad (AC) es una columna de proteína A.
- 20 5. Un método para la producción de un anticuerpo purificado, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión de Fc que utiliza una columna de proteína A, comprendiendo el método
 - a. cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, o la proteína de fusión de Fc, sobre la columna de proteína A;
 - b. lavar la columna de proteína A con una solución de lavado que comprende arginina, o una molécula seleccionada del grupo que consiste en acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butiroil-L-arginina y N-alfa-pivaloil arginina, a un pH mayor de 8.0; y
 - 25 c. eluir el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, o la proteína de fusión de Fc, a partir de la columna de proteína A, en donde el lavado se lleva a cabo sin la presencia de una sal no reguladora.
6. El método de la reivindicación 5, que comprende además equilibrar la columna de proteína A con un regulador de equilibrio antes de cargar y/o eluir el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, o la proteína de fusión de Fc, a partir de la columna de proteína A.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH es mayor de 8.5.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pH es de aproximadamente 8.5 a 9.5.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pH es de aproximadamente 8.9 a 9.0.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pH es de 9.0, o de aproximadamente 9.0.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la arginina está en una concentración en un rango de 0.1 a 0.5 M.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la arginina está en una concentración de o aproximadamente 0.25 M.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de lavado comprende arginina-HCl.
- 40 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de lavado elimina las impurezas seleccionadas a partir del grupo que consiste en las especies de alto peso molecular (HMWs), las proteínas de células huésped (HCPs), y las especies de bajo peso molecular (LMWs).
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de lavado comprende una o más sales reguladoras.