

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 213**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/20** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/KR2012/010899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13089477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12857495 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2791176**

54 Título: **Un método de purificación de anticuerpos**

30 Prioridad:

**15.12.2011 KR 20110135652**

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

**19.11.2018**

73 Titular/es:

**PRESTIGE BIOPHARMA PTE. LTD. (100.0%)  
15 Tech Park Crescent  
Singapore 638117, SG**

72 Inventor/es:

**YOON, JI YONG;  
LEE, DONG EUN;  
KIM, WON KYUM;  
YOUN, JEONG WON y  
BAEK, JUNG EUN**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 690 213 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

Un método de purificación de anticuerpos

## 5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un método para la preparación de una población de anticuerpos que tienen alta pureza y alta calidad mediante la retirada de isoformas e impurezas de anticuerpos a través del uso de una columna de intercambio catiónico, una columna de interacción hidrófoba y una columna de intercambio aniónico sucesivamente, sin el uso de una columna de proteína A; y a una población de anticuerpos preparada mediante el método anterior.

## [Antecedentes de la técnica]

15 Habitualmente se usa una columna de Proteína A en muchos de los procesos de purificación utilizados para la producción de fármacos de anticuerpos. El uso de la columna Proteína A tiene la ventaja de tener una producción con alta pureza en la etapa inicial del proceso. Sin embargo, el coste de la Proteína A es 30 veces más elevado que el de otras resinas de intercambio iónico utilizadas habitualmente, dando como resultado un alto coste de producción para los fármacos de anticuerpos.

20 De acuerdo con informes anteriores, la resina de Proteína A representa aproximadamente el 35 % de los costes de materia prima asociados a la producción de fármacos de anticuerpos (*Journal of Chromatography A*, 1024 (2004) 79-85) y las cantidades traza de Proteína A que permanecen en la muestra de anticuerpos pueden provocar respuestas inmunógenas u otras respuestas fisiológicas cuando se administran a seres humanos (*Purification Tools for Monoclonal Antibodies*, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996). Por tanto, los procesos de purificación que usan una columna de Proteína A requieren un control constante y la retirada de la Proteína A residual en cada etapa de purificación. Además, puesto que la Proteína A funciona basándose en su bioafinidad hacia la diana, tiene la desventaja de una baja estabilidad química. Por tanto, para mantener la bioactividad de la Proteína A, no puede usarse NaOH 1 M, aunque es esencial para la limpieza de la columna para que esté disponible para su uso posterior. Sin usar NaOH 1 M, es difícil retirar por completo las impurezas de la columna y, por tanto, el número de veces que la columna puede reutilizarse es sustancialmente menor que el número permitido por el uso de resinas químicas.

35 A pesar del alto coste, las principales compañías farmacéuticas globales prefieren usar Proteína A para la purificación de anticuerpos porque puede conseguir una alta pureza de anticuerpos en la etapa inicial. Por ejemplo, Genentech produce un fármaco de anticuerpo, en concreto, Herceptin, que se purifica a través de un proceso que utiliza Proteína A, una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico y una resina de interacción hidrófoba (CIH) (Sven Sommerfeld a, Jochen Strube b, *Chemical Engineering and Processing* 44 (2005) 1123-1137). Sin embargo, debido a las desventajas de la Proteína A descritas anteriormente, aún debe desarrollarse un método de purificación más eficaz y rentable para anticuerpos.

45 Con el fin de desarrollar un método de purificación de anticuerpos que no use la columna de Proteína A, el primer requisito para cualquier método alternativo es que retire las impurezas igual o más que la Proteína A. Especialmente cuando se usa una estirpe celular CHO como célula hospedadora para producir el anticuerpo, el cultivo celular no solo contiene los anticuerpos deseados, sino también una gran cantidad de impurezas incluyendo las proteínas de la célula hospedadora (PCH), los ADN derivados de la célula hospedadora (ACH) y los factores de crecimiento. Por tanto, en cualquier caso, al no usar Proteína A para la purificación de anticuerpos, la retirada satisfactoria de impurezas en la etapa inicial es un factor importante debido a la alta cantidad de impurezas.

50 Para resolver este problema, Warren Schwartz et al. han desarrollado un método de purificación de anticuerpos que usa MEP HyperCel, que es un tipo de cromatografía de inducción de carga hidrófoba (CICH) (*Journal of Chromatography A*, 908 (2001) 251-263). En este método, los anticuerpos que tienen alta pureza se aíslan sin ultrafiltración del cultivo celular que contiene sales. Sin embargo, la CICH sigue siendo de 2 a 5 veces más cara que el uso de resinas de intercambio iónico. Tampoco se ha descubierto si la retirada de impurezas a través de CICH es más eficaz que el uso de resinas de intercambio iónico. Mientras tanto, Egisto Boschetti ha propuesto el uso de una cromatografía tiófila (T-gel) que se basa en la afinidad química de la resina para producir un anticuerpo que tiene alta pureza, mientras que la cromatografía de Proteína A se basa en su propia bioafinidad (*J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 361-389). Sin embargo, el gel T aún no es tan eficaz como la Proteína A para la preparación de anticuerpos que tengan alta pureza y además su coste es 5 veces mayor que el del método que usa resinas de intercambio iónico. Por tanto, todavía no se ha utilizado en la industria.

65 Mientras tanto, como otro método de purificación, puede usarse una resina de intercambio iónico tal como una resina de intercambio catiónico en una columna de adsorción. Los ejemplos de resinas de intercambio catiónico que utilizadas actualmente en la industria incluyen CM Fast Flow y SP Fast Flow fabricadas por GE-healthcare y Fractogel SO<sub>3</sub> y Fractogel COO<sup>-</sup> fabricados por Merck (documento US2007029244). Sin embargo, una resina de intercambio catiónico todavía tiene la limitación de la retirada ineficiente de impurezas en la etapa inicial.

Análogamente, la optimización de las numerosas condiciones del proceso de purificación es la clave para un desarrollo satisfactorio de un nuevo proceso de purificación.

5 El documento WO 2007/117490 desvela un método para purificar anticuerpos que se expresaron en un sistema de expresión de una célula hospedadora, en el que al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico está comprendida en dicho método de purificación. La preparación de anticuerpos obtenida comprende una cantidad reducida de proteína de la célula hospedadora.

10 El documento WO 2008/087184 desvela un proceso para la purificación de proteínas que contienen FC. El método comprende al menos una etapa de purificación a través de cromatografía de intercambio catiónico.

15 En el proceso de purificación de anticuerpos, mantener la uniformidad de la calidad es tan importante como la retirada de impurezas. Un anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que están unidas por enlaces disulfuro, mientras que la porción Fc de la cadena pesada está glucosilada. Sin embargo, los anticuerpos producidos en las células CHO utilizadas como células hospedadoras incluyen diversas isoformas (Hongcheng Liu, Georgeen Gaza-Bulsecu, *Journal of Chromatography B*, 837 (2006) 35-43). La mayoría de las isoformas tienen pocas modificaciones de aminoácidos tales como la desamidación y la oxidación (Isamu Terashima, Akiko Koga, *Analytical Biochemistry* 368 (2007) 49-60). Especialmente, si la región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que es el sitio de unión a antígeno, se modifica por desamidación formando de este modo isoformas de anticuerpos, existe una reducción en la afinidad de unión del antígeno al anticuerpo, afectando de este modo a la bioactividad del anticuerpo (Reed J. Harris, Bruce Kabakoff, *Journal of Chromatography B*, 752 (2001) 233-245).

25 Pueden formarse diversos tipos de isoformas de anticuerpos, por ejemplo, mediante la desamidación de asparagina que produce aspartato (Boxu Yan, Sean Steen, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 98, N.º 10, octubre de 2009) y mediante la oxidación de metionina que produce sulfato de metionina. (Chris Chumsae, Georgeen Gaza-Bulsecu, *Journal of Chromatography B*, 850 (2007) 285-294). Además, puede transformarse glutamato en el extremo N terminal de las cadenas pesadas en piroglutamato mediante la formación de una estructura de anillo de cinco miembros (William E. Werner, Sylvia Wu, *Analytical Biochemistry* 342 (2005) 120-125). Puesto que estas isoformas afectan a la bioactividad de los anticuerpos, la proporción de isoformas presentes en el anticuerpo debe controlarse durante el proceso de producción del anticuerpo.

30 Para regular la cantidad de isoformas de anticuerpos, puede usarse una cromatografía de intercambio catiónico, puesto que puede aislar los anticuerpos deseados adsorbidos en la columna desorbiéndolos basándose en la diferencia en la carga neta, pero también deben especificarse condiciones de purificación apropiadas. La influencia del pH para la unión optimizada y la retirada de las células hospedadoras en la cromatografía de intercambio catiónico fue evaluada por Stein et al. (*Journal of Chromatography B*, 848 (2007) 151-158).

#### 40 [Divulgación]

#### [Problema técnico]

45 En un esfuerzo por desarrollar un método para la preparación de una población de anticuerpos con alta calidad y alta pureza sin el uso de una columna de Proteína A costosa, los inventores han desarrollado la presente invención, en la que el sobrenadante del cultivo celular que excluye las células se trata previamente mediante la reducción del pH para retirar los precipitados. Después, la muestra pretratada se hace pasar a través de una columna de intercambio catiónico, una columna de interacción hidrófoba y una columna de intercambio aniónico sucesivamente con el fin de retirar las impurezas tales como las proteínas de la célula hospedadora (PCH) eficazmente y, en última instancia, para la preparación de una población de alta calidad de anticuerpos con la relación deseada de anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos.

#### [Solución técnica]

55 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para la preparación de una población de anticuerpos en el que más del 65 % de la población son anticuerpos activos, que comprende: (a) cargar una muestra que comprende una mezcla de anticuerpos en una columna de intercambio catiónico preequilibrada, después, lavar opcionalmente la columna con un tampón de lavado y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) y las isoformas de anticuerpos de la muestra; en el que la muestra de la etapa (a) tiene una conductividad de 5 a 7 mS/cm; (b) cargar una muestra preparada mediante la mezcla de sal con el eluato de la etapa (a) en una columna de interacción hidrófoba (CIH) y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) del eluato de la etapa (a); y (c) cargar el eluato de la etapa (b) en una columna de intercambio aniónico y recoger el flujo continuo.

65 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una población de anticuerpos preparada mediante el método anterior, en el que más del 65 % de la población son anticuerpos activos.

**[Efectos ventajosos]**

Mediante el uso del método de preparación de la presente invención, las impurezas pueden retirarse eficazmente del cultivo celular productor de anticuerpos sin el uso de una columna de Proteína A costosa, produciendo de este modo una población deseada de anticuerpos con alta pureza y calidad.

**[Descripción de los dibujos]**

La FIG. 1 muestra el resultado de la EGPA-DSS después de retirar las impurezas en el medio de cultivo a pH 5, en la que M: Marcador de tamaño de proteína, 1: medio de cultivo, 2: filtración en profundidad (después de la retirada de las células) (Método 1), 3: después de la reducción del pH a pH 5 y 1 hora de agitación a baja velocidad (Método 1), 4: después de la filtración en profundidad y esterilizante (Método 1), 5: sobrenadante después de la reducción del pH a pH 5 y 1 hora de agitación a baja velocidad (Método 2), 6: después de la filtración en profundidad (Método 2), 7: después de la filtración esterilizante (Método 2);

la FIG. 2 muestra el resultado de la EGPA-DSS comparando el flujo continuo y el eluato recogidos de sobrenadante de cultivo celular, columna de Proteína A, columna de SP o columna de CarboxiMetilo (CM), en la que M: Marcador de tamaño de proteína, S: sobrenadante del cultivo celular, 1: flujo continuo de la columna de Proteína A, 2: flujo continuo de la columna de SP, 3: flujo continuo de la columna de CM, 4: eluato de la columna de Proteína A, 5: eluato de la columna de SP, 6: eluato de la columna de CM, 7: un fármaco de referencia, Herceptin®;

la FIG. 3 muestra un gráfico de un proceso AKTA, en el que la purificación se realizó utilizando la columna de CM;

la FIG. 4 muestra un gráfico de HPLC de IC, en el que la purificación se realizó utilizando la columna de CM;

la FIG. 5 muestra un gráfico del proceso AKTA, en el que la purificación se realizó usando la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M);

la FIG. 6 muestra un gráfico de HPLC de IC, en el que la purificación se realizó usando la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M);

la FIG. 7 muestra un gráfico de HPLC de IC del sobrenadante del cultivo, el eluato de la columna de CM y el eluato de la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M);

la FIG. 8 muestra un gráfico de HPLC de IC del sobrenadante del cultivo celular, el eluato de la columna de CM, el eluato de la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M) y el fármaco de referencia, Herceptin®;

la FIG. 9 muestra un gráfico del proceso AKTA que muestra cambios en los picos de las isoformas de anticuerpos básicas que dependen del volumen de una columna durante las 4 etapas del proceso de lavado en el método de purificación que usa la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M);

la FIG. 10 muestra un gráfico del proceso AKTA que muestra los efectos de las diferentes condiciones del tampón en la columna de cromatografía de interacción hidrófoba ((A) tampón pH 7,2, elución por etapas, (B) tampón pH 6,0, elución por etapas, (C) tampón pH 6,0, elución en gradiente de concentraciones);

la FIG. 11 es un diagrama de flujo que muestra todas las etapas en el método de purificación de anticuerpos de la presente invención; y

la FIG. 12 muestra un gráfico que muestra la cantidad de proteína de la célula hospedadora (PCH) retirada en cada etapa del método de purificación de anticuerpos de la presente invención.

**[Mejor modo]**

Como un aspecto, la presente invención proporciona un método para la preparación de una población de anticuerpos en el que más del 65 % de la población son anticuerpos activos, que comprende: (a) cargar una muestra que comprende una mezcla de anticuerpos en una columna de intercambio catiónico preequilibrada, después, lavar opcionalmente la columna con un tampón de lavado y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) y las isoformas de anticuerpos de la muestra; (b) cargar una muestra preparada mediante la mezcla de sal con el eluato de la etapa (a) en una columna de interacción hidrófoba (CIH) y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) del eluato de la etapa (a); y (c) cargar el eluato de la etapa (b) en una columna de intercambio aniónico y recoger el flujo continuo.

Los productos de anticuerpos producidos por la célula hospedadora contienen no solo los anticuerpos activos sino también diversas isoformas de anticuerpos, proteínas de la célula hospedadora, ADN derivado de la célula hospedadora y factores de crecimiento de la célula. Las isoformas de anticuerpos son las formas modificadas de anticuerpo por desamidación u oxidación de determinados aminoácidos y estas isoformas tienen diferentes bioactividades. Los productos de anticuerpos expresados en la célula hospedadora contienen una alta porción de isoformas de anticuerpos. Especialmente cuando se fabrican productos biosimilares de anticuerpos, es importante producir anticuerpos con alta calidad como fármaco de referencia. Por tanto, después de producir anticuerpos en las células hospedadoras, es esencial un proceso de purificación para controlar la cantidad de isoformas de anticuerpos en el producto del anticuerpo.

A este respecto, la presente invención proporciona un método para la preparación de una población de anticuerpos que comprende proporciones deseadas de isoformas de anticuerpos ácidos, anticuerpos activos e isoformas de

anticuerpos básicas, retirando proteínas de la célula hospedadora para aumentar la pureza de los anticuerpos y aumentando una proporción de anticuerpos activos en comparación con los del sobrenadante del cultivo inicial.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "una población de anticuerpos" se refiere a un grupo de anticuerpos que incluyen anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos. Para los fines de la presente invención, la población de anticuerpos se refiere a un grupo de anticuerpos que comprende una relación deseada de anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos. El grupo de anticuerpos puede comprender solamente un tipo de anticuerpo o ambos de anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos. Para los fines de la presente invención, la población de anticuerpos puede referirse preferentemente a un grupo, en el que una proporción de anticuerpos activos aumenta retirando las isoformas de anticuerpos e impurezas tales como proteínas de la célula hospedadora del sobrenadante del cultivo.

15 En particular, cuando el método de la presente invención se usa para preparar productos biosimilares de anticuerpos, la población de anticuerpos se refiere a un grupo que comprende anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos en la relación que es igual o correspondiente a un fármaco de referencia.

20 A través de un proceso de purificación que usa una columna de intercambio catiónico, puede prepararse la población deseada de anticuerpos que comprende una relación deseada de isoformas de anticuerpos y anticuerpos activos, preferentemente una proporción de anticuerpos activos que exceda el 65 %, más preferentemente una proporción de isoformas de anticuerpos básicas por debajo del 20 %. Específicamente, la población de anticuerpos puede comprender del 65 al 80 % de anticuerpos activos, del 15 al 30 % de isoformas de anticuerpos ácidas y del 5 al 20 % de isoformas de anticuerpos básicas. En un ejemplo de la presente invención, se preparó una población de anticuerpos usando una columna de intercambio de Fractogel COO<sup>-</sup> para comprender un 23,8 % de isoformas de anticuerpos ácidas, un 68,7 % de anticuerpos activos y un 7,5 % de isoformas de anticuerpos básicas, que es similar a las proporciones en el fármaco de referencia, en concreto, Herceptin® (Ejemplo 2 y Tabla 7).

30 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" es una sustancia que se produce en el sistema inmunitario mediante una estimulación antigénica y se une a un antígeno específico para inducir una reacción antígeno-anticuerpo mientras circula en la linfa y la sangre. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo es la proteína diana que se ha de purificar con una alta calidad y puede purificarse eficientemente mediante el método de la presente invención.

35 Debido a que el anticuerpo tiene un punto isoeléctrico más alto que otras proteínas, puede purificarse principalmente para que tenga una pureza relativamente alta mediante la carga del sobrenadante del cultivo en la columna de resina de intercambio catiónico. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una molécula de proteína tiene una carga neta cero, lo que significa que la carga eléctrica de la doble capa eléctrica de la molécula de proteína es cero. Cuando una proteína se disocia de su complejo unido, el número de catión es igual al del anión y, por tanto, su carga neta se vuelve cero. El anticuerpo que se ha de purificar en la presente invención puede incluir aquellos que tienen un punto isoeléctrico preferentemente de 7 a 11 y más preferentemente de 8 a 10. Además, el anticuerpo de la presente invención puede incluir preferentemente todos los anticuerpos con potencial terapéutico que se usan habitualmente en la técnica, más preferentemente, un anticuerpo dirigido contra HER-2 (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2), en concreto, trastuzumab o pertuzumab, y mucho más preferentemente trastuzumab. Trastuzumab es desarrollado por Genentech (EE. UU.) y también se denomina Herceptin. Es un anticuerpo humanizado que se dirige a HER2 y es conocido como un anticuerpo terapéutico para HER2/neu que se encuentra principalmente en las células de cáncer de mama.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo activo" se refiere a un constituyente principal incluido en la población de anticuerpos que se prepara mediante el método de la presente invención. Y se refiere a un anticuerpo que no tiene una actividad biológica reducida que puede ser provocada por modificaciones tales como la desamidación u oxidación de algunos aminoácidos en el anticuerpo. Es decir, un anticuerpo activo se refiere a un anticuerpo que no es una isoforma de anticuerpo ácida o básica. El anticuerpo activo es el constituyente más importante para la calidad de la población de anticuerpos y tiene las actividades biológicas más altas entre otros constituyentes del anticuerpo.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "una isoforma de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo modificado por desamidación u oxidación de ciertos aminoácidos en anticuerpos activos e incluye la isoforma de anticuerpo ácida y la isoforma de anticuerpo básica. Los ejemplos de las isoformas incluyen una isoforma de anticuerpo en la que la asparagina se desamina a aspartato o una isoforma de anticuerpo en la que la metionina se oxida a sulfato de metionina. Además, el glutamato en el extremo N terminal de la cadena pesada puede formar una estructura de anillo de cinco miembros y transformarse en piruglutamato que produce una isoforma de anticuerpo. Si las isoformas de anticuerpos se producen en la célula hospedadora tal como la estirpe celular CHO, los productos de anticuerpos contienen una alta proporción de isoformas en el cultivo celular.

65 Por tanto, las isoformas de anticuerpos deben retirarse mediante un proceso de purificación tal como la cromatografía para que la población de anticuerpos comprenda una proporción deseada de anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos. Análogamente, para obtener una población de anticuerpos con alta calidad a partir del

sobrenadante del cultivo, las isoformas de anticuerpos deben retirarse a un intervalo aceptable para que la población comprenda una proporción deseada de anticuerpos activos. Además, con el fin de producir anticuerpos con alta pureza, las impurezas tales como la proteína de la célula hospedadora (PCH), el ADN derivado de la célula hospedadora (ACH) y los factores de crecimiento deben retirarse de la población de anticuerpos. A este respecto, la presente invención proporciona un método para la preparación de la población de anticuerpos mediante la regulación de la cantidad de isoformas de anticuerpos y retirando eficazmente otras impurezas tales como proteínas de la célula hospedadora.

En la presente invención, la etapa (a) es para recoger el eluato que es una forma purificada de la muestra que comprende una mezcla de anticuerpos para tener la cantidad reducida de proteínas de la célula hospedadora (PCH) e isoformas de anticuerpos de los mismos. Para ser más específicos, la etapa (a) es para retirar las proteínas de la célula hospedadora (PCH) y las isoformas de anticuerpos de la muestra mediante la carga de una muestra que comprende una mezcla de anticuerpos en una columna de intercambio catiónico previamente equilibrada, (ii) y después, opcionalmente, lavar la columna con un tampón de lavado y (iii) eluir anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una muestra que comprende una mezcla de anticuerpos" se refiere a un sobrenadante del cultivo parcialmente purificado o extracto de células productoras de anticuerpos que comprenden tanto anticuerpos activos como isoformas de anticuerpos. Cuando los anticuerpos se producen en las células hospedadoras, la mezcla de anticuerpos activos e isoformas de anticuerpos está presente en el sobrenadante del cultivo o extracto celular. La expresión "parcialmente purificado" significa que permanecen proteínas distintas de los anticuerpos deseados incluso después de un proceso de fraccionamiento o procesos de fraccionamiento repetidos tales como la filtración.

La muestra que comprende la mezcla de los anticuerpos puede prepararse mediante un método que comprende (a) cultivar células hospedadoras para producir los anticuerpos y retirar las células hospedadoras para la preparación de un sobrenadante del cultivo; y (b) ajustar el pH del sobrenadante del cultivo al pH más bajo que el punto isoelectrico del anticuerpo diana, preferentemente pH de 4 a 6, para formar los precipitados y retirarlos.

Si el pH se ajusta antes de retirar las células del cultivo celular, un pH más bajo promueve la muerte celular, lo que aumenta la cantidad de proteínas de la célula hospedadora en el cultivo. Por tanto, el pH del cultivo celular debe modularse después de retirar las células con el fin de reducir la cantidad de proteínas de la célula hospedadora. Y la muestra preparada mediante este método puede usarse para una purificación más eficiente de la población de anticuerpos.

El método de retirada de células puede ser el método típico conocido en la técnica y puede realizarse preferentemente usando un filtro y, más preferentemente, un filtro de profundidad. En una realización de la presente invención, se descubrió que cuando el valor de pH del sobrenadante celular recuperado mediante filtración primaria de células se redujo a 5 y después el sobrenadante celular se sometió a re-filtración, el contenido de proteínas de la célula hospedadora es notablemente bajo, en comparación con la muestra para la carga de la columna de intercambio catiónico, que se preparó por filtración después de la reducción del valor de pH del caldo de cultivo que contiene células a 5 (Tabla 2 y FIG. 1).

Los anticuerpos que tienen un punto isoelectrico alto no forman agregados en condiciones ácidas con un pH bajo, mientras que las proteínas de la célula hospedadora (PCH) que tienen un punto isoelectrico más bajo que los anticuerpos no tienen carga neta en condiciones ácidas con un pH bajo, formando de este modo agregados mediante fuerzas de van der Waals y se produce una gran cantidad de precipitados. Por tanto, el intervalo de pH del sobrenadante del cultivo puede establecerse más bajo que un punto isoelectrico del anticuerpo deseado, pero cerca de un punto isoelectrico de las proteínas de la célula hospedadora, con el fin de aumentar la precipitación de las proteínas de la célula hospedadora. Es decir, el pH puede ser más bajo que el punto isoelectrico del anticuerpo deseado en una escala preferentemente de 1 a 6 y más preferentemente de 2 a 5. En consecuencia, el pH del sobrenadante puede estar en un intervalo preferentemente de 3 a 7, más preferentemente de 4 a 6 y mucho más preferentemente de 4,5 a 5,5. Los precipitados resultantes de ajustar el pH del sobrenadante pueden retirarse mediante un filtro que se usa habitualmente en la técnica (por ejemplo, un filtro esterilizante). En una realización de la presente invención, se descubrió que cuando los precipitados se forman reduciendo el pH a 5 y se retiran del sobrenadante, las siguientes etapas de purificación pueden realizarse más eficientemente para producir un producto más purificado.

Además, las condiciones de la muestra se ajustan para que tenga una conductividad de 5 a 7 mS/cm, antes de cargar la muestra.

En el método de preparación de la presente invención, la etapa (a) comprende la etapa de cargar la muestra preparada mediante el método anterior en la columna de intercambio catiónico preequilibrada, lavar opcionalmente la columna con un tampón de lavado y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución.

Como se usa en el presente documento, la expresión "columna de intercambio catiónico" se refiere a una columna rellena con una resina de intercambio catiónico. En la etapa anterior, puede realizarse una cromatografía de intercambio catiónico para retirar isoformas de anticuerpos del anticuerpo activo e impurezas, preferentemente proteínas de la célula hospedadora (PCH). La resina de intercambio catiónico significa una resina sintética que intercambia sus propios cationes con otros cationes en una solución acuosa. Debido a que los anticuerpos tienen un punto isoelectrico alto, se cargan positivamente en una solución tampón que tiene un valor de pH más bajo que el punto isoelectrico. Por tanto, la resina de intercambio catiónico capaz de adsorber los anticuerpos cargados positivamente se usa para mejorar la calidad de la población de anticuerpos. La resina de intercambio catiónico puede elegirse entre las que se usan normalmente en la técnica y podría ser, preferentemente, una columna que tenga un grupo funcional de  $\text{COO}^-$  o  $\text{SO}_3^-$ , y más preferentemente, carboximetilo (CM), fractogel, sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) o sulfonato (S) y, mucho más preferentemente, carboximetil sefarosa (CM sefarosa) o fractogel  $\text{COO}^-$ .

La etapa (a) se caracteriza porque puede retirar tanto las proteínas de la célula hospedadora como las isoformas de anticuerpos del anticuerpo activo.

A este respecto, las proteínas de la célula hospedadora pueden incluir todas las formas diferentes de impurezas, excluyendo los anticuerpos deseados. Específicamente, pueden incluir todos los ADN derivados de la célula hospedadora, los factores de crecimiento celular y las propias proteínas de la célula hospedadora. Por tanto, si estas proteínas de la célula hospedadora pueden retirarse eficazmente, los anticuerpos deseados restantes pueden purificarse con mucha facilidad produciendo un producto de anticuerpo que tiene una alta pureza.

Además de la etapa anterior, es necesario retirar las isoformas de anticuerpos para la preparación de la población de anticuerpos con alta calidad. Las isoformas de anticuerpos pueden ser una isoforma de anticuerpo ácida y/o una isoforma de anticuerpo básica. En general, hay presente una diversidad de isoformas de anticuerpos en los productos de anticuerpos expresados en las células hospedadora. Cuando se producen anticuerpos biosimilares, es importante preparar productos con un alto grado de similitud con el fármaco de referencia en términos de calidad del producto. Puesto que las isoformas de anticuerpos tienen una carga diferente a la de los anticuerpos activos debido a la modificación de varios aminoácidos, pueden aislarse de los anticuerpos deseados en función de esta diferencia de carga. Sin embargo, la diferencia de carga es muy pequeña, puesto que fue causada por solo unos pocos aminoácidos y, por tanto, para la purificación, debe establecerse una condición precisa para la purificación. Por esta razón, se usa una columna de intercambio catiónico en la presente invención para retirar la isoforma de anticuerpo ácida y/o la isoforma de anticuerpo básica.

Las isoformas de anticuerpos se refieren a anticuerpos que son resultado de la modificación por desamidación u oxidación de pocos aminoácidos en el anticuerpo. Puesto que las isoformas de anticuerpos tienen diferentes actividades biológicas, es importante mantener la cantidad de isoformas de anticuerpos a un nivel constante para un control de calidad. En general, el sobrenadante del cultivo contiene una alta proporción de isoformas de anticuerpos ácidas y básicas con respecto a los anticuerpos activos. Por tanto, la proporción de tres tipos diferentes de anticuerpos debe ajustarse mediante la reducción de las cantidades de isoformas de anticuerpos. Una proporción preferida de los anticuerpos activos en la población de anticuerpos es del 65 % o más, mientras que una proporción preferida de la isoforma básica del anticuerpo es del 20 % o menos. En la etapa (a), las proporciones del anticuerpo activo, la isoforma de anticuerpo ácida y la isoforma de anticuerpo básica se controlan para que estén preferentemente en un intervalo del 65 al 80 %, del 15 al 30 % y del 5 al 20 %, respectivamente.

En la etapa (a) anterior, el proceso de lavado puede comprender preferentemente las siguientes etapas: la primera etapa de lavado que permite la adsorción de los anticuerpos restantes en la columna; la segunda etapa de lavado para el equilibrado secundario de la columna; la tercera etapa de lavado que retira las isoformas de anticuerpos ácidas; y la cuarta etapa de lavado que permite la readsorción de isoformas de anticuerpos ácidas que no se retiraron durante la tercera etapa de lavado. El pH y la composición de la solución tampón para las etapas de lavado 1 a 4 anteriores pueden ajustarse dependiendo del tipo de isoformas de anticuerpos que se han de retirar o del tipo de columna utilizada en el proceso de purificación.

Con el fin de retirar las isoformas de anticuerpos ácidas de la muestra que comprende una mezcla de anticuerpos, puede usarse preferentemente una carboximetil sefarosa (CM sefarosa). En una realización preferida de la presente invención, la purificación del anticuerpo se realizó mediante el uso de CM sefarosa que tiene un grupo  $\text{COO}^-$ . Los resultados demostraron que no hubo ninguna diferencia entre el uso de CM sefarosa y Proteína A en términos de rendimiento y pureza del producto. Y el uso de CM sefarosa permitió la producción de anticuerpos con mayor rendimiento y pureza del producto que el uso de SP (Tabla 4).

El método de preparación que usa carboximetil sefarosa puede comprender preferentemente (i) cargar la muestra en la columna de carboximetil sefarosa (CM sefarosa) previamente equilibrada con un tampón de equilibrado que comprende acetato de sodio 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM (NaCl); (ii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM; (iii) lavar la columna con un tampón que comprende Tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (Tris-HCl) (pH de 7,0 a 7,5); (iv) lavar la columna con un tampón que comprende Tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH

de 7,0 a 7,5) y cloruro de sodio de 20 a 30 mM; (v) lavar la columna con un tampón que comprende Tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH de 7,0 a 7,5); y (vi) eluir los anticuerpos de la columna con un tampón de elución que comprende Tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH de 7,0 a 7,5) y cloruro de sodio de 80 a 100 mM. En una realización de la presente invención, se descubrió que el anticuerpo se purificó a través de las etapas de equilibrado-carga-lavado 1-lavado 2-lavado 3-lavado 4-desprendimiento-separación-regeneración de la columna (Tabla 5), aumentando de este modo el contenido del anticuerpo activo al 10 % o más (FIG. 4, Tabla 7).

Además, la retirada tanto de la isoforma de anticuerpo ácida como de la isoforma de anticuerpo básica puede hacerse preferentemente usando fractogel  $\text{COO}^-$ .

Si una gran cantidad de las isoformas de anticuerpos básicas se mezcla con las isoformas de anticuerpos ácidas, es necesaria una columna de intercambio catiónico que pueda retirar tanto los anticuerpos ácidos como los anticuerpos básicos para la preparación de la población deseada de anticuerpos. En este caso, las isoformas de anticuerpos ácidas y las isoformas de anticuerpos básicas pueden retirarse al mismo tiempo usando fractogel  $\text{COO}^-$ , compuesto de una resina de polímero de metacrilato sintético como soporte, a diferencia de CM que tiene un grupo funcional de  $\text{COO}^-$  pero está compuesto por un soporte a base de sefarosa. En una realización de la presente invención, cuando la purificación del anticuerpo se realizó usando fractogel  $\text{COO}^-$ , la isoforma de anticuerpo básica, así como la isoforma de anticuerpo ácida podrían retirarse eficazmente (Tabla 7 y FIG. 8).

El método de preparación usando fractogel  $\text{COO}^-$  puede comprender preferentemente (i) cargar la muestra en la columna de fractogel  $\text{COO}^-$  preequilibrada con un tampón de equilibrado que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio 35 a 45 mM (NaCl); (ii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio a 35 a 45 mM; (iii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5); (iv) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) y cloruro de sodio de 45 a 55 mM; (v) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5); y (vi) eluir los anticuerpos de la columna con un tampón de elución que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM y cloruro de sodio de 70 a 90 mM. En una realización de la presente invención, se descubrió que el anticuerpo se purificó a través de las etapas de equilibrado-carga-lavado 1-lavado 2-lavado 3-lavado 4-desprendimiento-separación-regeneración de la columna (Tabla 6), aumentando de este modo el contenido del anticuerpo activo al 14 % o más y disminuyendo el contenido de la isoforma básica del anticuerpo a aproximadamente el 4 % o más (FIG. 6 y Tabla 7).

En la presente invención, la etapa (b) es para recoger un eluato de la columna de interacción hidrófoba (CIH), que tiene una cantidad reducida de PCH en comparación con el eluato de la etapa (a). Para ser más específicos, la etapa (b) comprende (i) cargar una muestra preparada mediante la mezcla del eluato de la etapa (a) con sales, en la columna de interacción hidrófoba (CIH) que está preequilibrada con un tampón de equilibrado y (ii) eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución.

El eluato de los anticuerpos recogido de la etapa (a) puede ser el eluato recogido inicialmente o una forma diluida del mismo con un tampón adicional. La muestra para la cromatografía de interacción hidrófoba puede prepararse añadiendo sales al eluato de la etapa (a). El tipo de sal añadida a la muestra no está limitado, pero en una realización de la presente invención, se añadió citrato de sodio al eluato de la etapa (a). Además, una concentración de sal de la muestra anterior puede ajustarse para que sea de 0,8 a 1,2 veces más alta que la del tampón de equilibrado utilizado en la columna de interacción hidrófoba en la etapa (b) y más preferentemente la muestra puede prepararse añadiendo sales al eluato de los anticuerpos de la etapa (a) de manera que pueda tener la misma concentración de sal que el tampón de equilibrado.

Además, la etapa (b) anterior puede eluir el anticuerpo preferentemente en un gradiente de concentración lineal. En una realización de la presente invención, la elución del gradiente de concentración es más eficaz que la elución en etapas en términos de rendimiento y volumen de elución (Ejemplo 3).

La etapa (b) anterior es aumentar la pureza de los productos de anticuerpos mediante la retirada de impurezas tales como las proteínas de la célula hospedadora que no se retiraron durante la etapa (a). La etapa (b) utiliza una columna de interacción hidrófoba y puede retirar las proteínas de la célula hospedadora en función de la diferencia en la hidrofobia, que tiene un mecanismo de separación diferente de la columna de intercambio catiónico de la etapa (a).

Como se usa en el presente documento, la expresión "columna de interacción hidrófoba (CIH)" se refiere a una columna rellena con resinas de interacción hidrófoba. En la etapa anterior, la cromatografía de interacción hidrófoba se realiza para retirar las impurezas, preferentemente las proteínas de la célula hospedadora. La estructura terciaria de la proteína es generalmente hidrófila, pero la proteína tiene una porción hidrófoba también dentro de su estructura general. Y una hidrofobia de esta porción no surge en las condiciones en las que una interacción electrostática entre proteínas es fuerte. Pero si aumenta la fuerza iónica o la permitividad de un solvente, lo que debilita la interacción electrostática, entonces la hidrofobia de la proteína se volverá relativamente más fuerte. A este respecto, si se introduce un ligando hidrófobo (cadena hidrocarbonada larga o anillo aromático) en un soporte de cromatografía hidrófilo (pieza de gel de agarosa, soporte de polímero orgánico, etc.) y se equilibra con sales a



una alta concentración, puede adsorberse una diversidad de proteínas a estos ligandos. Posteriormente, a medida que disminuye la concentración de sal, las proteínas pueden separarse fácilmente a medida que eluyen de acuerdo con sus propiedades. Es decir, cuando se crea un entorno hidrófobo ajustando una concentración de sal, las proteínas tendrán una fuerza de adsorción diferente a una columna específica basándose en su hidrofobia. Usando este principio, la etapa (b) puede realizarse para retirar PCH usando la columna de interacción hidrófoba.

La resina de interacción hidrófoba puede elegirse entre las utilizadas habitualmente en la técnica. Preferentemente, incluye una columna de fenilo, una columna de butilo, una columna de fenil sefarosa o fractogel EMA fenilo, etc. y más preferentemente fenil sefarosa.

La etapa (b) que usa la columna de interacción hidrófoba puede comprender preferentemente las siguientes etapas, (i) cargar una muestra preparada mediante el ajuste de la concentración de citrato de sodio del eluato de la etapa (a) para que sea la misma que en un tampón de equilibrado que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) y citrato de sodio 0,3 a 1,0 M, a la columna de interacción hidrófoba (CIH) que se preequilibra con el tampón de equilibrado; y (ii) eluir los anticuerpos con un tampón de elución que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) en un gradiente lineal.

En una realización de la presente invención, cuando se usó un tampón de acetato de sodio de pH 6,0, el rendimiento del producto fue mayor, en comparación con cuando se usó tris-cloruro de hidrógeno. Además, la elución en gradiente mostró un alto rendimiento del producto, en comparación con una elución en etapas (Tabla 9). Estos resultados demuestran que el método anterior que implica una elución en gradiente es una forma eficiente de preparar una población de anticuerpos que tenga alta pureza.

En la presente invención, la etapa (c) es recoger una población deseada de anticuerpos retirando las impurezas del eluato obtenido de la etapa (b). Específicamente, la etapa (c) anterior es para recoger el flujo continuo mediante la carga del eluato de la etapa (b) en la columna de intercambio aniónico. Además, el eluato recogido de la etapa (b) anterior puede ser el propio eluato recogido o una forma diluida con solución tampón adicional.

Como se usa en el presente documento, la expresión "columna de intercambio aniónico" se refiere a una columna rellena con resinas de intercambio aniónico. En la etapa anterior, la cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse para retirar las impurezas, preferentemente proteínas de la célula hospedadora. La resina de intercambio aniónico se refiere a una resina sintética que intercambia sus propios aniones con otros aniones en una solución. La columna de intercambio aniónico puede adsorber proteínas que se cargan negativamente a un pH más alto que su punto isoeléctrico. Puesto que los anticuerpos tienen un punto isoeléctrico alto, cuando se usa una solución tampón neutra, esos anticuerpos no se unirán a la resina, sino que fluirán a través de la columna. Por otro lado, las impurezas, tales como las proteínas de la célula hospedadora, tienen un punto isoeléctrico bajo y, por tanto, se adsorben a la resina de intercambio aniónico y se retiran fácilmente. La etapa (c) puede realizarse basándose en este principio.

La resina de intercambio aniónico puede elegirse entre las utilizadas habitualmente en la técnica. Los ejemplos de dicha resina incluyen preferentemente Q sefarosa, aminoetilo cuaternario, amina cuaternaria (Q) o similares y más preferentemente Q Fast Flow.

Además, el método anterior puede usar un tampón de equilibrado que tenga un pH más bajo que el punto isoeléctrico (pI) de los anticuerpos diana, preferentemente un tampón con un pH de 7,0 a 8,0 y más preferentemente un tampón que contenga tris-cloruro de hidrógeno con un pH de 7,0 a 8,0. En un ejemplo de la presente invención, cuando se usó Q Fast Flow como resina de intercambio aniónico y Tris-cloruro de hidrógeno como tampón de equilibrado, la pureza y el rendimiento del producto de los anticuerpos fueron mayores que cuando se usaba el tampón MES. Además, se descubrió que un intervalo de pH de 7,0 a 8,0 era el más apropiado para la formación de anticuerpos (Tabla 11).

Como se ha descrito anteriormente, las proteínas de la célula hospedadora que se han de retirar pueden incluir todas las impurezas, excluyendo los anticuerpos deseados y también pueden incluir todos los ADN derivados de la célula hospedadora, factores de crecimiento celular o similares y las propias proteínas de la célula hospedadora. Por tanto, si las proteínas de la célula hospedadora se retiran en primer lugar, los anticuerpos deseados pueden purificarse más fácilmente con alta calidad y pureza. Además, en la etapa (c), la columna de intercambio aniónico puede retirar eficazmente endotoxinas, así como proteínas de la célula hospedadora, purificando de este modo la población deseada de anticuerpos con una alta pureza.

En general, a través del método de purificación de anticuerpos de la presente invención que comprende las etapas anteriores (a) a (c), los anticuerpos pueden prepararse con alta pureza y rendimiento de producto mediante la retirada eficaz de las impurezas, especialmente las proteínas de la célula hospedadora. La concentración de la proteína de la célula hospedadora en la muestra purificada final puede estar en un intervalo de 0,0001 a 10 ppm preferentemente o en un intervalo de 0,001 a 5 ppm más preferentemente. En un ejemplo de la presente invención, la concentración de las proteínas de la célula hospedadora se redujo a menos de 550 ppm después de la primera purificación, por debajo de 100 ppm después de la segunda purificación y por debajo de 5 ppm después de la

tercera purificación (Figura 12). Además, en otro ejemplo de la presente invención, se confirmó que el presente método de purificación de anticuerpos puede preparar una población de anticuerpos con una pureza del 99,9 % (Tabla 13).

5 Como otro aspecto, la presente invención proporciona una población de anticuerpos en la que más del 65 % de la población son anticuerpos activos preparados mediante el método anterior.

El método, la población de anticuerpos y la población de anticuerpos en la que más del 65 % de la población son anticuerpos activos son los mismos que se han descrito anteriormente.

10 **[Modo de invención]**

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a cada Ejemplo.

15 **Ejemplo 1. Pretratamiento de caldo de cultivo para la purificación de anticuerpos**

Se cultivaron las células CHO que expresan el anticuerpo trastuzumab recombinante (ATCC N.º CCL 61) para expresar el anticuerpo trastuzumab y después el valor de pH se redujo a 6 o menos para adsorber el anticuerpo sobre la columna de intercambio catiónico.

En este ejemplo, se realizaron dos métodos para la comparación. En el Método 1, el sobrenadante del cultivo se recuperó mediante la retirada de las células del caldo de cultivo a través de una filtración primaria usando un filtro de profundidad y después el valor de pH del sobrenadante del cultivo se redujo a 5, seguido de la re-filtración del sobrenadante del cultivo. En el Método 2, el valor de pH del caldo de cultivo que contenía células se redujo a 5 y después el caldo de cultivo se sometió a filtración usando el filtro de profundidad, para preparar una muestra para la carga de la columna de intercambio catiónico. El experimento se realizó para la comparación de los dos métodos (Tabla 1).

30 [Tabla 1]

Dos métodos para retirar impurezas por reducción del pH del caldo de cultivo		
Procedimiento	Método 1	Método 2
1	Caldo de cultivo	Caldo de cultivo
2	Recuperación de sobrenadante mediante la retirada de células usando un filtro de profundidad	Reducción del pH a 5 mediante la adición de ácido acético al 10 % al caldo de cultivo
3	Reducción del pH a 5 mediante la adición de ácido acético al 10 % al sobrenadante	Agitación a baja velocidad a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 1 hora
4	Agitación a baja velocidad a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 1 hora	Recuperación de sobrenadante mediante la retirada de células y precipitados usando un filtro de profundidad
5	Eliminación de los precipitados mediante filtros de profundidad y esterilizante, y esterilización	Esterilización mediante un filtro esterilizante y retirada de precipitados residuales

Para la comparación de los dos métodos se compararon los rendimientos y el contenido de las proteínas de la célula hospedadora (PCH) después de la columna de intercambio catiónico.

35 Como resultado, el Método 1 de retirada de células principalmente mostró un rendimiento del 84 % y un contenido final de proteínas de la célula hospedadora de 47,3 ppm después de la columna de intercambio catiónico. Por el contrario, el Método 2 de reducción directamente del pH del caldo de cultivo mostró un rendimiento final del 82 % después del pretratamiento y un contenido de la célula hospedadora de 110,6 ppm después de la columna de intercambio catiónico (Tabla 2).

40 [Tabla 2]

Comparación de los rendimientos y el contenido de PCH después de la columna de intercambio catiónico en el Método de pretratamiento 1 y el Método 2					
Sección	Procedimiento	pH	Viabilidad (%)	Rendimiento (%)	Proteínas de la célula hospedadora (PCH, ppm)
Método 1	Caldo de cultivo	7,1	92,3	100	
	Filtro de profundidad (retirada de células)	7,1			
	Reducción del pH a 5 y 1 h de agitación a baja velocidad	5,0		86	

Comparación de los rendimientos y el contenido de PCH después de la columna de intercambio catiónico en el Método de pretratamiento 1 y el Método 2					
Sección	Procedimiento	pH	Viabilidad (%)	Rendimiento (%)	Proteínas de la célula hospedadora (PCH, ppm)
	Filtros de profundidad y esterilizante	5,0		84	
	Después de la columna de intercambio catiónico				47,3
Método 2	Caldo de cultivo	7,1	92,3	100	
	Reducción del pH a 5 y 1 h de agitación a baja velocidad	5,0	73,9		
	Filtro de profundidad (retirada de células y precipitados)	5,0		83	
	Filtro esterilizante	5,0		82	
	Después de la columna de intercambio catiónico				110,6

La comparación de la viabilidad celular mostró que la viabilidad celular se redujo del 92,3 % al 73,9 % 1 hora después de la reducción del pH a 5 en el Método 2 y el contenido final de proteínas de la célula hospedadora aumentó 2 veces después la columna de intercambio catiónico.

5 Estos resultados demuestran que el método de pretratamiento de retirada de células principalmente usando un filtro de profundidad antes del procesamiento es adecuado para aplicar el método de purificación de la presente invención.

10 Además, los dos métodos de retirada de precipitados mediante reducción del pH a 6 o menos (preferentemente pH 5) se realizaron para obtener el sobrenadante que tiene una pureza mucho mayor que el caldo de cultivo inicial (FIG. 1).

### 15 **Ejemplo 2. Cromatografía de intercambio catiónico**

#### 2-1. Selección de la resina de intercambio catiónico

20 Como alternativa a la columna de Proteína A, se seleccionaron candidatos de la columna de intercambio catiónico, como se muestra en la Tabla 3 y se realizaron experimentos para seleccionar una columna que tuviera un grupo funcional favorable en términos de pureza y rendimiento de las columnas de intercambio catiónico.

25 Se usaron dos columnas, SP (propilo sulfúrico, fuerte, GE) que tenía un grupo funcional de SO<sub>3</sub> y CM (carboxilo metilo, semanal, GE) que tenía un grupo funcional de COO<sup>-</sup>, que son las resinas de intercambio catiónico utilizadas habitualmente en el proceso de producción y la Proteína A FF (GE) como grupo de control para comparar sus rendimientos y purezas para la selección de la resina de intercambio catiónico.

30 El sobrenadante se preparó mediante un pretratamiento del caldo de cultivo (título: 0,5 mg/ml) de acuerdo con el Método 1 del Ejemplo 1 y se le añadió agua destilada al mismo para reducir la conductividad a 6,4 mS/cm, preparando de este modo una muestra para cargarla en la columna de resina de intercambio catiónico.

[Tabla 3]

Grupos experimentales para la selección de la columna primaria			
Proceso	Grupo de control	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
	rPA FF (Proteína A, GE)	SP FF (Cación fuerte, GE)	CM FF (Cación semanal, GE)
Columna	20 ml de rProteína A FF	20 ml de SP FF	20 ml de CM FF
Tampón de equilibrado	Tris-HCl 20 mM pH 7,5	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0
Carga	100 ml (0,5 mg/ml) de resina 25 mg/ml	Con 7 mS/cm o menos, (6,4 mS/cm), resina 25 mg/ml pH 6,0	Con 7 mS/cm o menos (6,4 ms/cm), resina 25 mg/ml pH 6,0
Tampón de lavado 1	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0
Tampón de lavado 2	Tris-HCl 20 mM pH 7,5	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0 + NaCl 40 mM	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0 + NaCl 40 mM
Tampón de elución	HCl de glicina 100 mM pH 3,0	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0	Fosfato de Na 20 mM pH 6,0
		+ NaCl 200 mM	+ NaCl 200 mM

Grupos experimentales para la selección de la columna primaria			
Proceso	Grupo de control	Grupo experimental 1	Grupo experimental 2
Análisis	Rendimiento (cuantificación por medición de absorbancia UV) Pureza (HPLC CET, TSK3000)		

Los resultados de EGPA-DSS en las tres condiciones mostraron que, como se muestra en la FIG. 2, que los anticuerpos no se detectaron en el flujo continuo de las columnas de Proteína A y CM, mientras que los anticuerpos se detectaron en el flujo continuo de SP, lo que indica una pérdida de anticuerpo. Cuando los rendimientos se analizaron mediante la cuantificación de las concentraciones, SP mostró un rendimiento bajo del 2,5 % (Tabla 4). Además, SP mostró la pureza más baja del 96,4 % y rPA y CM mostraron una pureza del 99,2 % y del 97,5 %, respectivamente (Tabla 4).

[Tabla 4]

Comparación de rendimiento y pureza entre las columnas de intercambio catiónico SP y CM y la columna de Proteína A					
Proceso	Volumen (ml)	Conc. (mg/ml)	Cantidad (mg)	Rendimiento de la etapa (%)	Pureza (%)
Sobrenadante del cultivo	100	0,53	53		
rPA	16,4	3,24	53,1	100	99,2
SP	53,9	0,96	51,7	97,5	96,4
CM	53,5	1,04	55,6	105	97,5

Estos resultados demuestran que, como la resina de intercambio catiónico alternativa a la columna de Proteína A para la purificación del anticuerpo trastuzumab, CM sefarosa que tiene el grupo funcional COO<sup>-</sup> es ventajosa sobre el SP en términos de rendimiento y pureza.

## 2-2. Control de isoformas de anticuerpos usando resina de intercambio catiónico CM

Basándose en los resultados del Ejemplo 2-1, se realizaron experimentos para el control de isoformas de anticuerpos usando la resina de intercambio catiónico CM. El procedimiento para controlar las isoformas de anticuerpos usando la resina de intercambio catiónico CM es el siguiente.

Para el equilibrado, se aplicaron a la columna 6 volúmenes de columna de una solución tampón que comprendía acetato de sodio 20 mM (pH 5,0) y cloruro de sodio 40 mM. El sobrenadante pretratado se cargó a un volumen inferior al volumen de adsorción de CM (columna 25 mg/ml). Después de la carga, se realizó el Lavado 1 para adsorber los anticuerpos no unidos y lavar el sobrenadante residual. Se realizó el Lavado 2 para el equilibrado secundario mediante la aplicación de 10 volúmenes de columna de Tris HCl 25 mM (pH 7,2). Se realizó el Lavado 3 para retirar una parte de las isoformas de anticuerpos ácidas usando Tris HCl 25 mM (pH 7,2) y cloruro de sodio 25 mM. Se realizó el Lavado 4 para re-adsorber las isoformas de anticuerpos ácidas que permanecieron después de la retirada en la columna, usando Tris HCl 25 mM (pH 7,2).

La elución se realizó usando Tris HCl 25 mM (pH 7,2) y cloruro de sodio 90 mM para recuperar la población deseada de anticuerpos. Los procedimientos detallados se muestran en la siguiente Tabla 5.

[Tabla 5]

Procedimiento de purificación para isoformas de anticuerpos usando resina de intercambio catiónico CM		
Procedimiento	Tampón	Volumen
Equilibrado	Acetato de sodio 20 mM pH 5,0, NaCl 40 mM (6VC)	6 volúmenes de columna
Carga	Conductividad Con 6,4 mS/cm o menos, volumen de adsorción: 25 mg/ml de columna o menos	
Lavado 1	Acetato de sodio 20 mM pH 5,0, NaCl 40 mM (5VC)	5 volúmenes de columna
Lavado 2	Tris HCl 25 mM pH 7,2 (10VC)	10 volúmenes de columna
Lavado 3	Tris HCl 25 mM pH 7,2 + NaCl 25 mM (conductividad 4,86 mS/cm)	10 volúmenes de columna o más
Lavado 4	Tris HCl 25 mM pH 7,2 (3VC)	3 volúmenes de columna
Desprendimiento	Tris HCl 25 mM pH 7,2 + NaCl 90 mM (3VC) (conductividad 11 mS/cm)	3 volúmenes de columna
Separación	NaCl 2 M	2 volúmenes de columna
Regeneración de la columna	NaOH 1 M	3 volúmenes de columna

La FIG. 3 es un gráfico que muestra el Proceso AKTA para el examen de los procedimientos anteriores. La FIG. 4 es un gráfico de HPLC de IC para el análisis del contenido de isoformas de anticuerpos, en el que el pico de isoforma de anticuerpo ácida se redujo cuando el anticuerpo activo eluyó después de retirar una parte de la isoforma de anticuerpo ácida en el Lavado 3.

5 Por tanto, el contenido del activo el anticuerpo se aumentó al 10 % o más retirando la isoforma de anticuerpo ácida mediante el procedimiento de lavado anterior.

10 Estos resultados demuestran que la columna de CM utilizada en el método de purificación usando la columna de intercambio catiónico retira eficazmente la porción de anticuerpos ácidos en la población.

**2-3. Control de isoformas de anticuerpos usando la resina de intercambio catiónico Fractogel COO<sup>-</sup> (M)**

15 Cuando los anticuerpos tales como el Trastuzumab se expresan en células animales (por ejemplo, células CHO), el sobrenadante celular comprende tanto isoformas de anticuerpos ácidas como isoformas de anticuerpos básicas. Por tanto, existe la necesidad de identificar una columna de intercambio catiónico adecuada para retirar tanto las isoformas de anticuerpos ácidas como las isoformas de anticuerpos básicas del sobrenadante.

20 En detalle, los efectos de retirar la isoforma de anticuerpo ácida y la isoforma de anticuerpo básica se examinaron mediante el uso de fractogel COO<sup>-</sup> (M) compuesto por una resina de polímero de metacrilato sintético como soporte, a diferencia de CM que tiene un grupo funcional COO<sup>-</sup> pero está compuesto de un soporte a base de sefarosa.

25 La muestra de carga se preparó mediante pretratamiento del sobrenadante del cultivo de acuerdo con el Método 1 del Ejemplo 1 y se cargó a un volumen de adsorción de 25 mg o menos por 1 ml de la resina Fractogel COO<sup>-</sup> (M). El experimento se realizó a una velocidad lineal de 150 cm/h usando la columna que tiene una altura de 15 cm. El procedimiento para controlar las isoformas de anticuerpos usando la resina de intercambio catiónico Fractogel COO<sup>-</sup> (M) es el siguiente.

30 Se usó acetato (acetato de sodio) como tampón de Fractogel COO<sup>-</sup> (M). El Lavado 1 después de la carga es una etapa de fijación del anticuerpo y retirada del sobrenadante del cultivo. El lavado 2 es una etapa de reequilibrado de aumento del valor de pH de 5 a 6 con el fin de mejorar la separación de las isoformas del anticuerpo. El Lavado 3 es una etapa de retirada de la isoforma de anticuerpo ácida. El Lavado 4 es una etapa de re-adsorción de la isoforma de anticuerpo ácida después de retirar una parte de la misma y el desprendimiento es una etapa de recuperación del anticuerpo deseado.

35 La separación es una etapa de retirada de impurezas que estaban fuertemente unidas a la columna. A continuación, la columna se regeneró usando NaOH 1 M. Los procedimientos detallados se muestran en la siguiente Tabla 6.

[Tabla 6]

Procedimiento de purificación para las isoformas de anticuerpos usando Fractogel COO <sup>-</sup>		
Procedimiento	Tampón	Volumen
Equilibrado	Acetato de sodio 20 mM pH 5,0, NaCl 40 mM (10 VC)	10 volúmenes de columna
Carga	Conductividad Con 6,0 mS/cm o menos, volumen de adsorción: 25 mg/ml de columna o menos	
Lavado 1	Acetato de sodio 20 mM pH 5,0, NaCl 40 mM (5 VC)	5 volúmenes de columna
Lavado 2	Acetato de sodio 30 mM pH 6,0 (10 VC)	10 volúmenes de columna
Lavado 3	Acetato de sodio 30 mM pH 6,0, NaCl 50 mM (10 VC)	Al máximo
Lavado 4	Acetato de sodio 30 mM pH 6,0	2 volúmenes de columna
Desprendimiento	Acetato de sodio 30 mM pH 6,0, NaCl 80 mM	Hasta la reascensión
Separación	NaCl 2 M	2 volúmenes de columna
Regeneración de la columna	NaOH 1 M	3 volúmenes de columna

40 La FIG. 5 es un gráfico que muestra el proceso AKTA de realización de la purificación usando Fractogel COO<sup>-</sup> (M). Como se muestra en el pico de UV del gráfico, se observó un pico de una gran cantidad de isoformas de anticuerpos ácidas en la etapa de Lavado 3 después de la carga y se observó un pico del anticuerpo deseado eluido en la etapa de desprendimiento, seguido de un pico de una gran cantidad de isoformas de anticuerpos básicas. Como se muestra en el gráfico CEX-HPLC de la FIG. 6, cuando los anticuerpos deseados eluyeron después de retirar una

45

parte de las isoformas de anticuerpos ácidos y las isoformas de anticuerpos básicas, el contenido de anticuerpo activo fue un 14 % más alto que el de la muestra de carga inicial.

Como se muestra en las FIG. 7 y 8; y en la Tabla 7, la eficacia de retirada de la isoforma de anticuerpo básica fue aproximadamente un 8 % más alta que la de la columna de CM. El contenido de isoforma de anticuerpo básico en el fármaco de referencia, Herceptin® fue inferior al 10 %. Cuando el caldo de cultivo que contenía una gran cantidad de isoformas de anticuerpos básicas se purificó usando la columna de Fractogel COO<sup>-</sup> (M), las isoformas de anticuerpos básicas, así como las isoformas de anticuerpos ácidos se retiraron eficientemente (Tabla 7; y FIG. 7 y 8).

[Tabla 7]

Comparación de la calidad mediante análisis por HPLC-CI			
Sección	Contenido de isoforma de anticuerpo ácida (%)	Contenido de anticuerpo activo (%)	Contenido de isoforma de anticuerpo básica (%)
Calidad de la Carga (sobrenadante del cultivo)	34,0	54,7	11,3
Calidad del anticuerpo activo eluido por Fractogel COO <sup>-</sup> (M)	23,8	68,7	7,5
Calidad del anticuerpo activo eluido por CM	18,4	66,3	15,3
Calidad de Herceptin, fármaco de referencia	22,3	71,1	6,6

#### 2-4. Condiciones de control de las isoformas de anticuerpos básicas que usan resina de intercambio catiónico Fractogel COO<sup>-</sup> (M)

En este Ejemplo, se desarrolló un método para ajustar el contenido de separación de las isoformas de anticuerpos básicas mediante el control del volumen de lavado en los procedimientos de purificación.

Con el fin de ajustar el contenido de separación de las isoformas de anticuerpos básicas, el volumen de lavado se controló en la etapa de Lavado 4 justo antes de la elución del anticuerpo activo. Se descubrió que el contenido de isoformas de anticuerpos básicas estaba ajustado. El Lavado 4 es una etapa de readsorción de las isoformas de anticuerpos ácidos después de retirarlas. El experimento se realizó bajo el supuesto de que aparecen diferentes picos de elución dependiendo del grado de readsorción.

En la etapa de Lavado 4, la elución se realizó usando 1,5, 3 y 5 volúmenes de columnas. Como resultado, a medida que aumentaba el volumen de columna, aumentaba el pico de elución de las isoformas de anticuerpos básicas (FIG. 9). Las principales muestras de elución se analizaron usando HPLC de IC. Como resultado, cuando los volúmenes de columna aumentaron en la etapa de Lavado 4, los contenidos de isoformas de anticuerpos básicas se redujeron en las principales muestras de elución (Tabla 8). Si los contenidos de las isoformas de anticuerpos ácidos y básicas en el caldo de cultivo son más altos que los del fármaco de referencia, el método de la presente invención puede usarse para producir la isoforma de anticuerpo ácida, el anticuerpo activo y la isoforma de anticuerpo básica en un contenido similar al del fármaco de referencia (tabla 8).

[Tabla 8]

Cambios de contenido en HPLC de IC por variación del volumen de lavado en la etapa de Lavado 4 de Fractogel COO <sup>-</sup>					
Sección	Volumen de Lavado 4 (volumen de columna)	Contenido de isoforma de anticuerpo ácida (%)	Contenido de anticuerpo activo (%)	Contenido de isoforma de anticuerpo básica (%)	Rendimiento (%)
Carga (sobrenadante del cultivo)	-	40,0	52,5	7,5	
Lavado 4 de Fracto (1,5VC)	1,5	26,0	65,2	7,2	71
Lavado 4 de Fracto (3VC)	3	33,6	61,3	5,1	62
Lavado 4 de Fracto (5VC)	5	22,3	71,1	3,2	52
Herceptin®, el fármaco de referencia	-	19,3	74,9	5,8	

**Ejemplo 3. Condiciones de columna para cromatografía de interacción hidrófoba**

El experimento para la purificación de anticuerpos de alta pureza se realizó mediante una cromatografía de interacción hidrófoba (CIH), flujo rápido de fenil sefarosa.

5 Para la columna de CIH, la resina de intercambio catiónico Fractogel COO<sup>-</sup> (M) se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2-4 y el eluato se usó para realizar el experimento en las tres condiciones de la Tabla 9.

10 En primer lugar, en el grupo Experimental (A), la adsorción se realizó usando Tris HCl (pH 7,2) como tampón básico y citrato de sodio 0,6 M y la elución se realizó usando tampón de elución al 100 % (tampón sin sal) mediante elución por etapas. En el grupo Experimental (B), la adsorción se realizó usando acetato de sodio (pH 6,0) como tampón básico y citrato de sodio 0,6 M, y la elución se realizó mediante elución por etapas como en el grupo Experimental (A). En el grupo Experimental (C), la adsorción se realizó usando acetato de sodio (pH 6,0) como tampón básico y citrato de sodio 0,6 M, y la elución se realizó mediante elución en gradiente con 5 volúmenes de columna del tampón de elución.

15 El tampón y el pH y el método de elución se seleccionaron comparando los tres métodos.

20 Se usaron dos tipos de tampones, Tris HCl (pH 7,2) y acetato de sodio (pH 6,0) para la comparación, porque el acetato de sodio (pH 6,0) se usa como un tampón básico en la resina de intercambio catiónico y se usa Tris HCl como tampón básico en la tercera columna QFF para simplificar el proceso de producción en términos de preparación de tampón.

25 Como se muestra en el gráfico del proceso AKTA de la FIG. 10, los picos de elución principales se dividieron en las condiciones de (A) y (B) y los volúmenes de elución también fueron 2 veces más altos que en las condiciones de (C). Sin embargo, el pico de elución fue estable sin dividirse en las condiciones de (C) y el volumen de elución también fue el más bajo entre las tres condiciones. El volumen de elución menor es ventajoso porque puede reducirse el tiempo de trabajo de la siguiente etapa. Los resultados de la comparación de las tres condiciones mostraron que la elución en gradiente con 5 volúmenes de columna del tampón de elución fue mucho mejor con respecto a la elución por etapas en términos de rendimiento y el tampón de acetato de sodio (pH 6,0) mostró un rendimiento un 5 % mayor que el tampón Tris HCl (pH 7,2) y, por tanto, el tampón de acetato de sodio (pH 6,0) fue el tampón de CIH más adecuado porque la condición de pH bajo es estable en términos de estabilidad del anticuerpo frente al pH (Tabla 9).

35 [Tabla 9]

Condiciones para la columna de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH)				
Grupo Experimental	Condiciones	Volumen de elución de CIH (volumen de columna)	Pureza (%)	Rendimiento (%)
Carga	Eluato de Fractogel COO <sup>-</sup> (M)		99,4	-
(A)	Solución de carga de CIH: Eluato de Fractogel COO <sup>-</sup> (M) + volumen igual de un tampón que comprende Tris HCl 50 mM pH 7,2 y citrato de sodio 1,2 M/Tampón de equilibrado: Tris HCl 25 mM pH 7,2 + citrato de sodio 0,6 M/Condiciones de elución: Tris HCl 25 mM pH 7,2 (elución por etapas)	10	99,4	70
(B)	Solución de carga de CIH: Eluato de Fractogel COO <sup>-</sup> (M) + volumen igual de un tampón que comprende acetato de sodio 60 mM pH 6,0 y citrato de sodio 1,2 M/Tampón de equilibrado: acetato de sodio 30 mM pH 6,0 + citrato de sodio 0,6 M/Tampón de elución: acetato de sodio 30 mM (elución por etapas)	13	99,6	75
(C)	Solución de carga de CIH: Eluato de Fractogel COO <sup>-</sup> (M) + volumen igual de un tampón que comprende acetato de sodio 60 mM pH 6,0 y citrato de sodio 1,2 M/Tampón de equilibrado: acetato de sodio 30 mM pH 6,0 + citrato de sodio 0,6 M/Condiciones de elución: acetato de sodio 30 mM (elución en gradiente con 5 volúmenes de columna)	6	99,6	90

**Ejemplo 4. Condiciones para la cromatografía de intercambio aniónica**

40 La presente invención desarrolló un método de purificación para la preparación de una población de anticuerpos de alta pureza mediante el uso de una resina de intercambio catiónico y una resina de interacción hidrófoba sucesivamente y, después, usando una cromatografía de resina de intercambio aniónico.

Específicamente, las proteínas aniónicas en el pH por encima del punto isoelectrico pueden adsorberse a la columna de intercambio aniónico. Por tanto, los anticuerpos con un punto isoelectrico superior a 7 (por ejemplo, Trastuzumab con un punto isoelectrico de 8,4), estos anticuerpos no pueden adsorberse a la resina de intercambio aniónico y eluirán como un flujo continuo si se usa una solución tampón con un pH de 7. A este respecto, los inventores han

5 realizado los siguientes experimentos para especificar las condiciones de la resina de intercambio aniónico y la solución tampón adecuada para el proceso de purificación de la presente invención.

En este Ejemplo, se usó Flujo Rápido Q a base de amina cuaternaria (GE) utilizada con frecuencia como resina de intercambio aniónico a escala de producción para realizar la purificación. Para la preparación de una muestra que se

10 ha de cargar en la resina de intercambio aniónico, el sobrenadante del cultivo se sometió a una columna de intercambio catiónico, a una columna de interacción hidrófoba (CIH) y a una ultrafiltración/diafiltración primaria para tener una conductividad y un pH adecuados. La pureza, el contenido de PCH y el rendimiento se compararon en las tres condiciones de tampón de MES 25 mM (pH 6,0), Tris HCl 25 mM (pH 7,0) y Tris HCl 25 mM (pH 8,0) (Tabla 10).

15 [Tabla 10]

Condiciones para la columna de intercambio aniónico			
	Grupo experimental A	Grupo experimental B	Grupo experimental C
Tampón	Tris 25 mM	Tris 25 mM	MES 25 mM
pH	8	7	6
Conductividad mS/cm	4 o menos	4 o menos	4 o menos
Columna	QFF	QFF	QFF
Volumen de adsorción mg/ml resina	150	150	150
Concentración de la solución de carga (mg/ml)	10 o menos	10 o menos	10 o menos
Velocidad lineal (cm/h)	150	120	120

Los resultados experimentales de las tres condiciones se muestran en la Tabla 11. Cuando se compararon la pureza o el rendimiento y el contenido de PCH, se descubrió que el tampón de pH 7 o superior fue mucho mejor que el

20 tampón de pH 6. Por tanto, se prefirió el uso de tampón Tris HCl de pH 7 a 8 (Tabla 11).

[Tabla 11]

Comparación de la pureza, el contenido de PCH y el rendimiento en tres condiciones					
Grupo Experimental	Condiciones	Columna	Pureza (%)	PCH (ppm)	Rendimiento (%)
(A)	Tampón de equilibrado: Tris HCl 25 mM pH 8,0	QFF	99,6	1,52	98,1
(B)	Tampón de equilibrado: Tris HCl 25 mM pH 7,0	QFF	99,7	1,61	98,5
(C)	Tampón de equilibrado: MES 25 mM pH 6,0	QFF	99,8	2,53	97,3

#### **Ejemplo 5. Examen de la retirada de PCH, el rendimiento de la purificación y la pureza en cada etapa del proceso de trastuzumab**

25 Las etapas de purificación del proceso de purificación de anticuerpos desarrollado en la presente invención, preferentemente, un proceso de purificación de trastuzumab, se muestran en la FIG. 11.

30 Para analizar el contenido de PCH durante el proceso, se realizó un método de cuantificación ELISA. La cuantificación de PCH de las muestras durante el proceso de purificación de trastuzumab se realizó usando un kit de ELISA de proteína de la célula hospedadora CHO (Pangen, Cat. PKD1001, Lote 17011002) recubierto con anticuerpo anti-CHO PCH frente a proteínas de células CHO. La retirada de PCH en cada etapa del proceso se analizó para 3 lotes, que se muestra en la FIG. 12.

35 El contenido inicial de PCH fue de 14000 ppm o más después del proceso de recuperación del caldo de cultivo y el contenido de PCH se redujo a menos de 550 después de la columna de intercambio catiónico y se redujo a menos de 100 ppm después del proceso de CIH. Además, se redujo a menos de 5 ppm después de la resina de intercambio aniónico, produciendo de este modo el trastuzumab retirado de la proteína de la célula hospedadora (FIG. 12).

40 A continuación, se calcularon los rendimientos de purificación de los 3 lotes. Para el análisis del rendimiento, el contenido en el caldo de cultivo se analizó usando la columna de Proteína A y después se analizó mediante la medición de absorbancia UV después de la resina de intercambio catiónico. Como se muestra en la siguiente Tabla 12, el rendimiento de la etapa fue de aproximadamente el 77 al 79 % por la pérdida de rendimiento debida a la



retirada de partes de las isoformas ácidas y de anticuerpos básicos para el control de calidad en el proceso de resina de intercambio catiónico después de la recuperación y se observó una pérdida de rendimiento muy baja hasta la terminación de la purificación después de la resina de intercambio catiónico (Tabla 12).

5

[Tabla 12]

Comparación de rendimientos de purificación entre 3 lotes			
Proceso	Rendimiento total (%)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Caldo de cultivo	100	100	100
Recuperación	96,9	95,8	97,2
Resina de intercambio catiónico	78,6	77,0	77,8
Inactivación de virus	77,7	75,0	76,5
Resina de interacción hidrófoba	77,4	74,8	71,7
Ultrafiltración/diafiltración primaria	76,5	70,7	71,7
Resina de intercambio aniónico	73,8	69,3	70,1
Ultrafiltración/diafiltración secundaria	76	71,6	68,1
Filtración de virus	71,5	70,3	68,7
Formulación	72,3	71,3	71,3

A continuación, se analizaron las purezas de los 3 lotes. Para el análisis de pureza, se usó HPLC-ET (cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño) para realizar el análisis. Se usó TSK-Gel 3000SW<sub>XL</sub> (Tosoh Bioscience) como columna y cada muestra se diluyó usando PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) a 10 mg/ml, se inyectaron 20 µl de la misma para su análisis. El análisis se realizó a 280 nm usando PBS como la fase móvil con un caudal de 0,5 ml/min durante 30 minutos.

10

Como resultado, las purezas finales de los tres lotes fueron del 99,9 %, lo que fue un 0,3 % superior a la pureza del fármaco de control del 99,6 % (Tabla 13). Estos resultados demuestran que el método de la presente invención, que comprende las etapas de usar una columna de intercambio catiónico, una columna de intercambio de CIH y aniónica, puede usarse eficazmente para la producción de una población deseada de anticuerpos con alta pureza y alta calidad.

15

[Tabla 13]

Comparación de purezas entre 3 lotes			
Proceso	Rendimiento total (%)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Caldo de cultivo			
Recuperación			
Resina de intercambio catiónico	99,7	99,1	99,7
Inactivación de virus	99,8	98,8	99,7
Resina de interacción hidrófoba	99,9	99,9	99,6
Ultrafiltración/diafiltración primaria	99,7	99,5	99,8
Resina de intercambio aniónico	99,8	99,6	99,6
Ultrafiltración/diafiltración secundaria	99,8	99,9	99,9
Filtración de virus	99,9	99,9	99,9
Formulación	99,9	99,9	99,9
Fármaco de referencia	99,6		

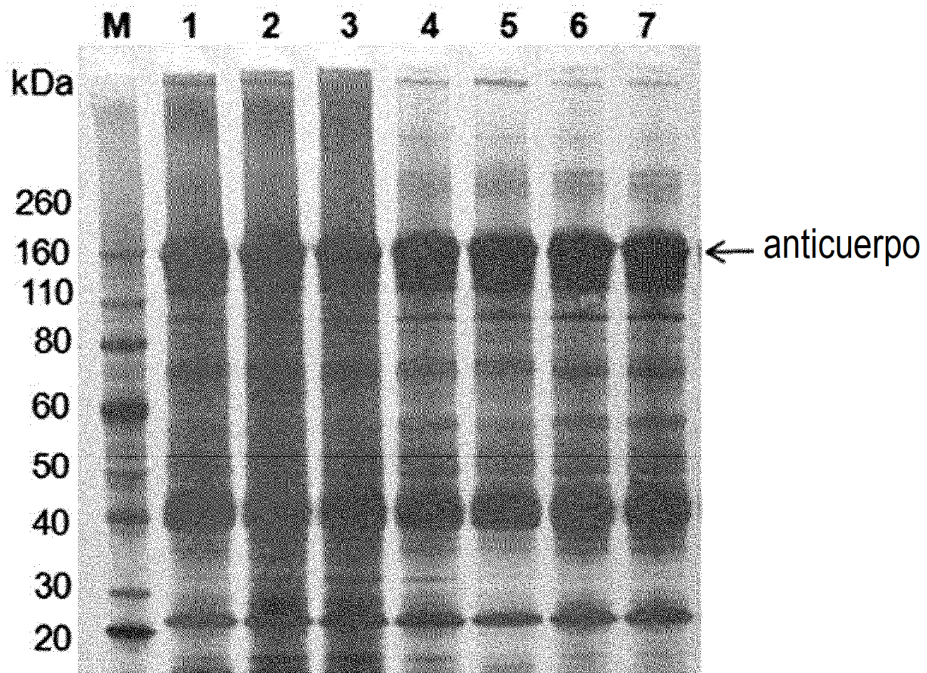
20

## REIVINDICACIONES

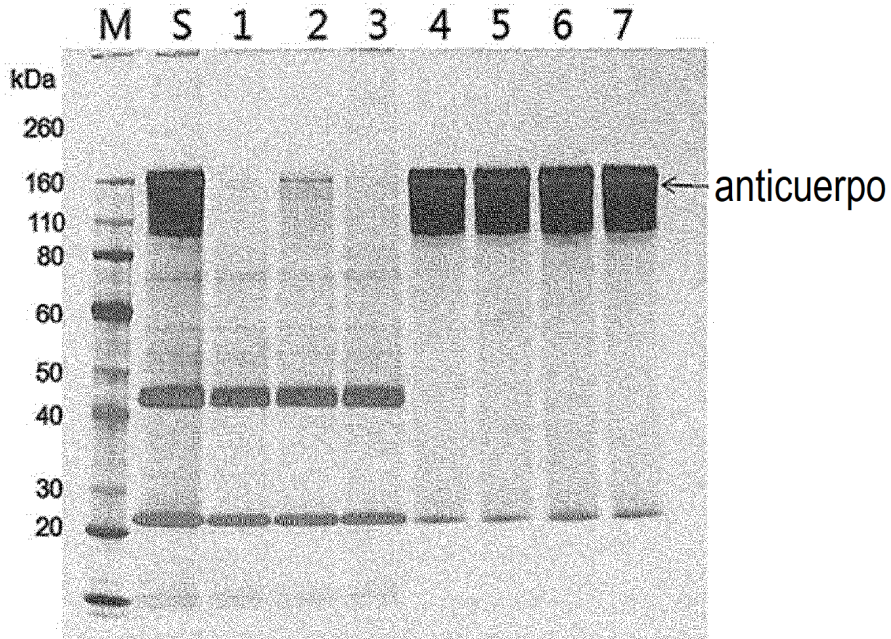
1. Un método para la preparación de una población de anticuerpos en el que más del 65 % de la población son anticuerpos activos, que comprende:
- 5 (a) cargar una muestra que comprende una mezcla de anticuerpos en una columna de intercambio catiónico preequilibrada, después, lavar opcionalmente la columna con un tampón de lavado y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) y las isoformas de anticuerpos de la muestra,
- 10 en el que la muestra de la etapa (a) tiene una conductividad de 5 a 7 mS/cm;
- (b) cargar una muestra preparada mediante la mezcla de sal con el eluato de la etapa (a) en una columna de interacción hidrófoba (CIH) y eluir los anticuerpos unidos a la columna con un tampón de elución, retirando de este modo las proteínas de la célula hospedadora (PCH) del eluato de etapa (a); y
- 15 (c) cargar el eluato de la etapa (b) en una columna de intercambio aniónico y recoger el flujo continuo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de la etapa (a) se prepara ajustando el pH de un sobrenadante del cultivo para que esté en un intervalo de pH de 4 a 6 con el fin de retirar precipitados.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene un punto isoeléctrico de 8 a 10; o el anticuerpo es Trastuzumab.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el eluato de la etapa (a) comprende del 65 al 80 % de anticuerpos activos, del 15 al 30 % de isoformas de anticuerpos ácidos y del 5 al 20 % de isoformas de anticuerpos básicas.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la isoforma de anticuerpo de la etapa (a) es una isoforma de anticuerpo ácida.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la columna de intercambio catiónico de la etapa (a) es una columna de carboximetil (CM) sefarosa.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa (a) comprende:
- (i) cargar la muestra en la columna de carboximetil (CM) sefarosa preequilibrada con un tampón de equilibrado que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM (NaCl);
- 40 (ii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM;
- (iii) lavar la columna con un tampón que comprende tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (Tris-HCl) (pH de 7,0 a 7,5);
- (iv) lavar la columna con un tampón que comprende tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH de 7,0 a 7,5) y cloruro de sodio de 20 a 30 mM;
- 45 (v) lavar la columna con un tampón que comprende tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH de 7,0 a 7,5); y
- (vi) eluir anticuerpos de la columna con un tampón de elución que comprende Tris-cloruro de hidrógeno de 20 a 30 mM (pH de 7,0 a 7,5) y cloruro de sodio de 80 a 100 mM.
- 50 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la isoforma de anticuerpo de la etapa (a) es una isoforma de anticuerpo ácida y una isoforma de anticuerpo básica.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la columna de intercambio catiónico de la etapa (a) es una columna de fractogel COO<sup>-</sup>.
- 55 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa (a) comprende:
- (i) cargar la muestra en la columna de fractogel COO<sup>-</sup> preequilibrada con un tampón de equilibrado que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM (NaCl);
- 60 (ii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 20 a 30 mM (pH de 4,5 a 5,5) y cloruro de sodio de 35 a 45 mM;
- (iii) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5);
- (iv) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) y cloruro de sodio de 45 a 55 mM;
- (v) lavar la columna con un tampón que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5); y
- 65 (vi) eluir anticuerpos de la columna con un tampón de elución que comprende acetato de sodio de 25 a 35 mM y cloruro de sodio de 70 a 90 mM.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los anticuerpos unidos a la columna de la etapa (b) eluyen con un gradiente lineal en el componente de sal del tampón de elución.
- 5 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (b) comprende
- (i) cargar una muestra preparada ajustando la concentración de citrato del eluato de la etapa (a) para que sea la misma que en un tampón de equilibrado que comprende acetato de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) y citrato de sodio de 0,3 a 1,0 M, en una columna de interacción hidrófoba (CIH) que se preequilibra con el tampón de equilibrado; y
- 10 (ii) eluir los anticuerpos con un tampón de elución que comprende acetato de 25 a 35 mM (pH de 5,5 a 6,5) en un gradiente lineal.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
- 15 (a) la columna de interacción hidrófoba de la etapa (b) es una columna de fenil sefarosa; o  
(b) la columna de intercambio aniónico de la etapa (c) es una columna de Flujo Rápido Q.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la columna de intercambio aniónico se equilibra con un tampón de equilibrado en un intervalo de pH 7,0 a 8,0, antes de la carga.
- 20 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el tampón de equilibrado comprende Tris-HCl (de pH 7,0 a 8,0).

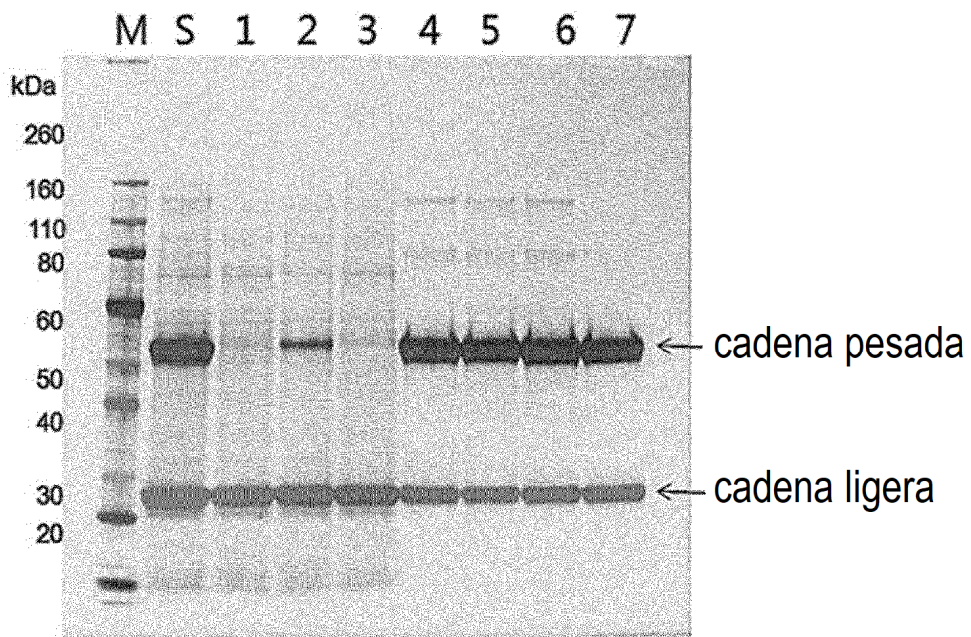
[Fig. 1]



[Fig. 2]

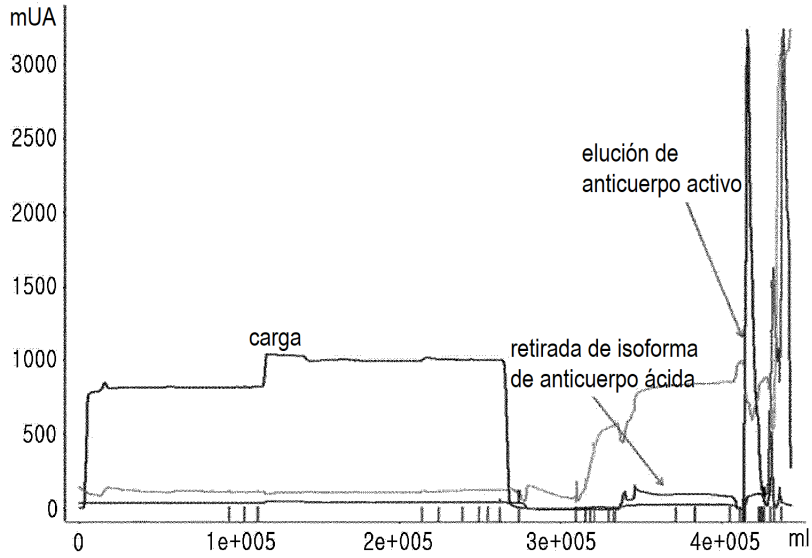


No reducido

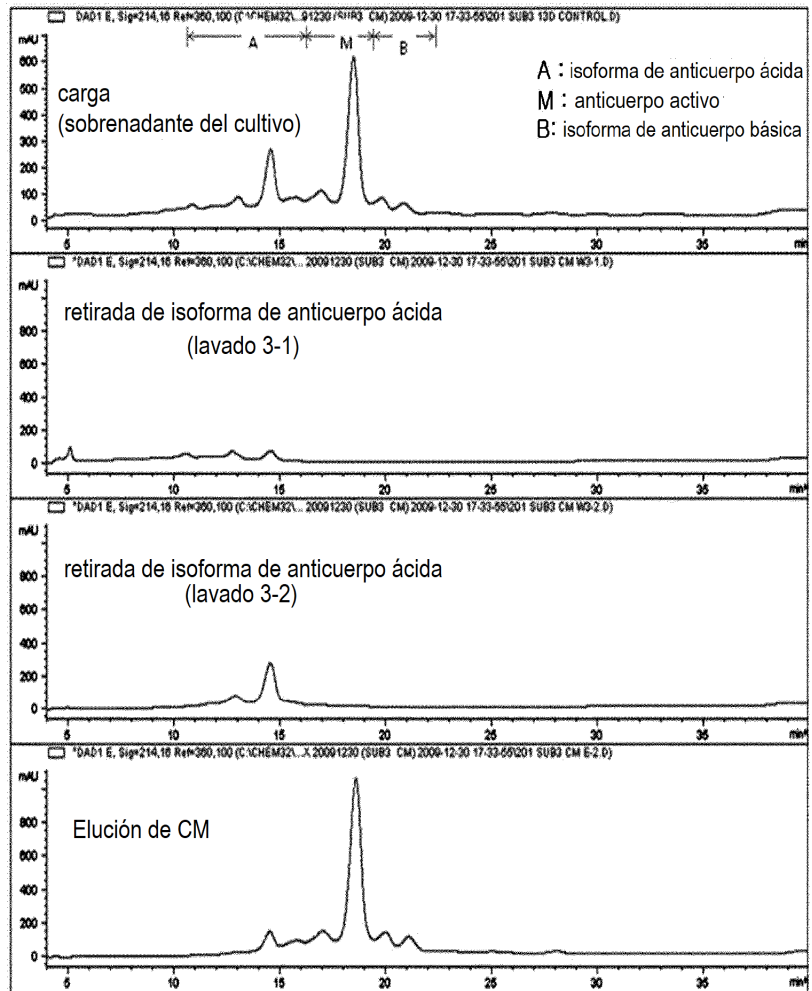


Reducido

[Fig. 3]

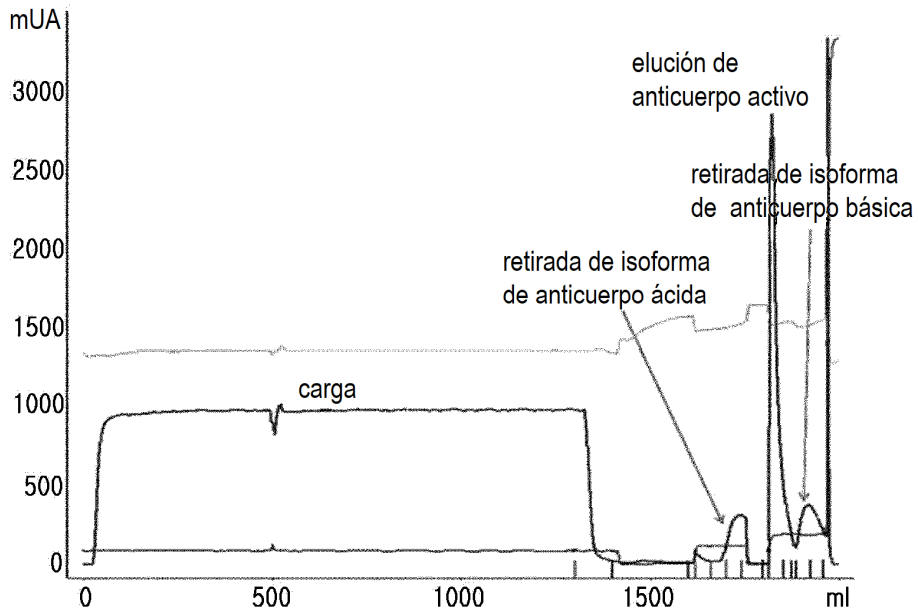


[Fig. 4]

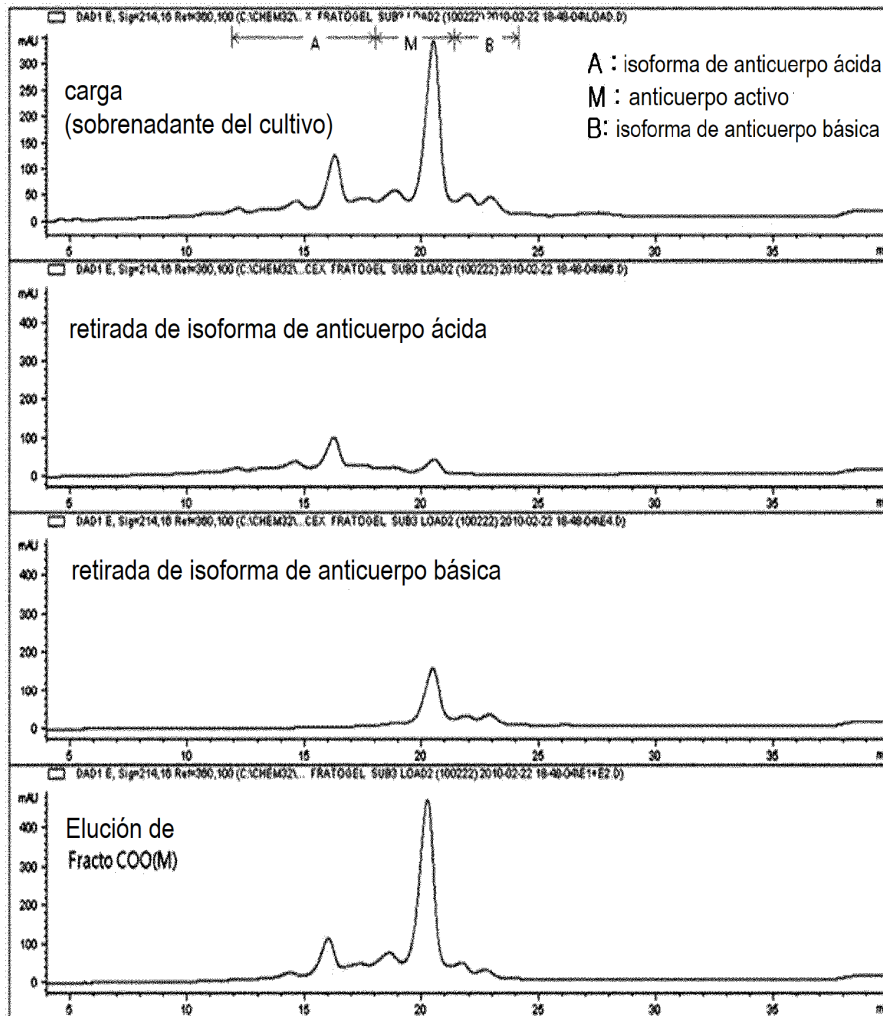




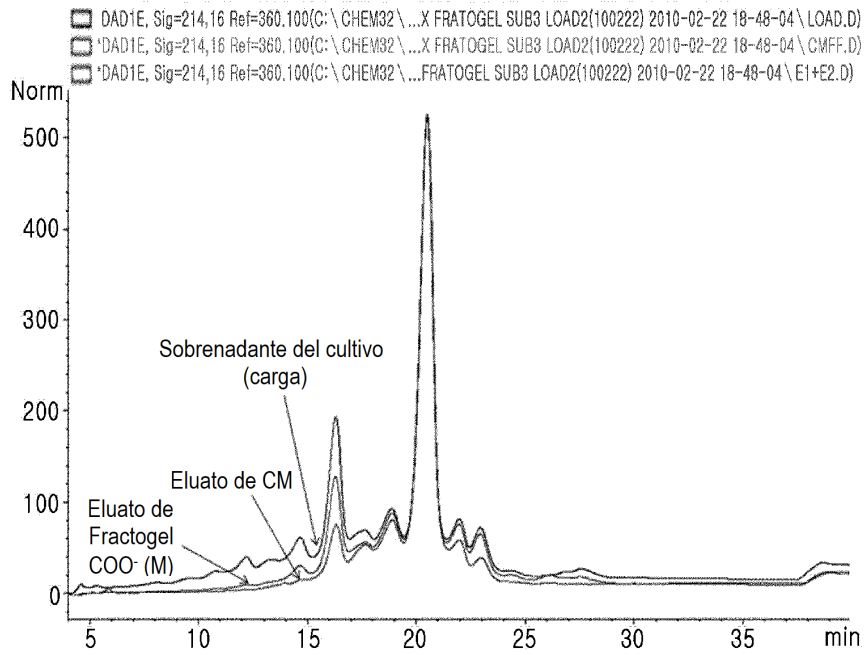
[Fig. 5]



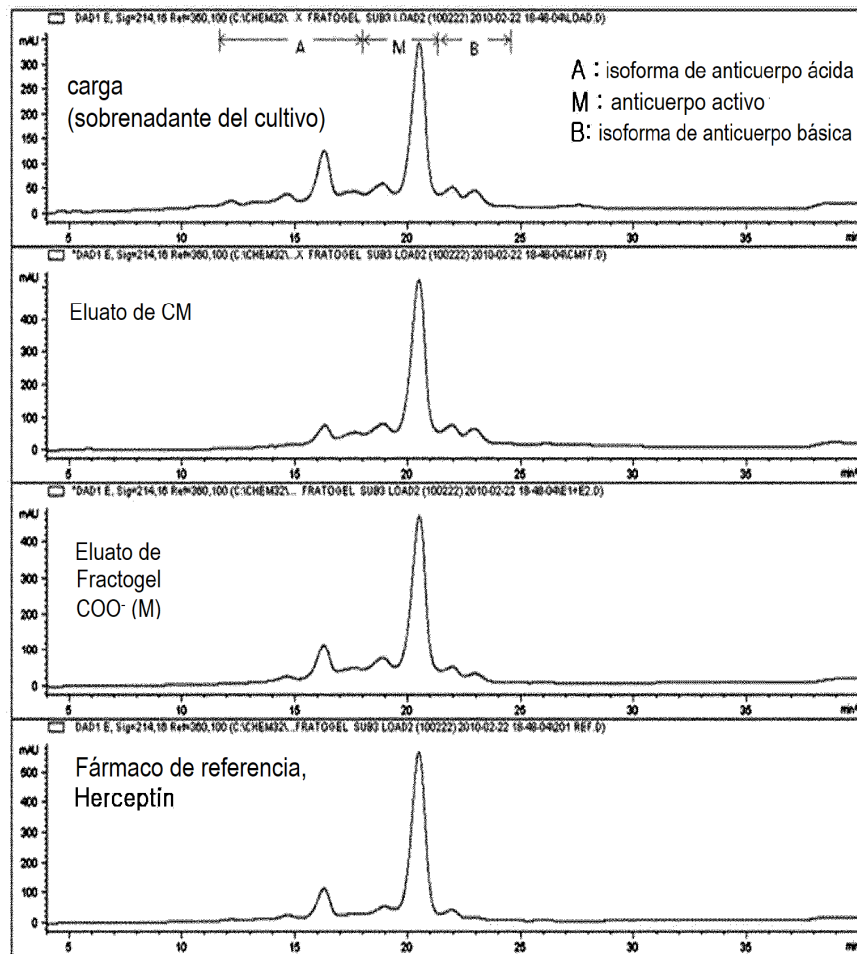
[Fig. 6]



[Fig. 7]

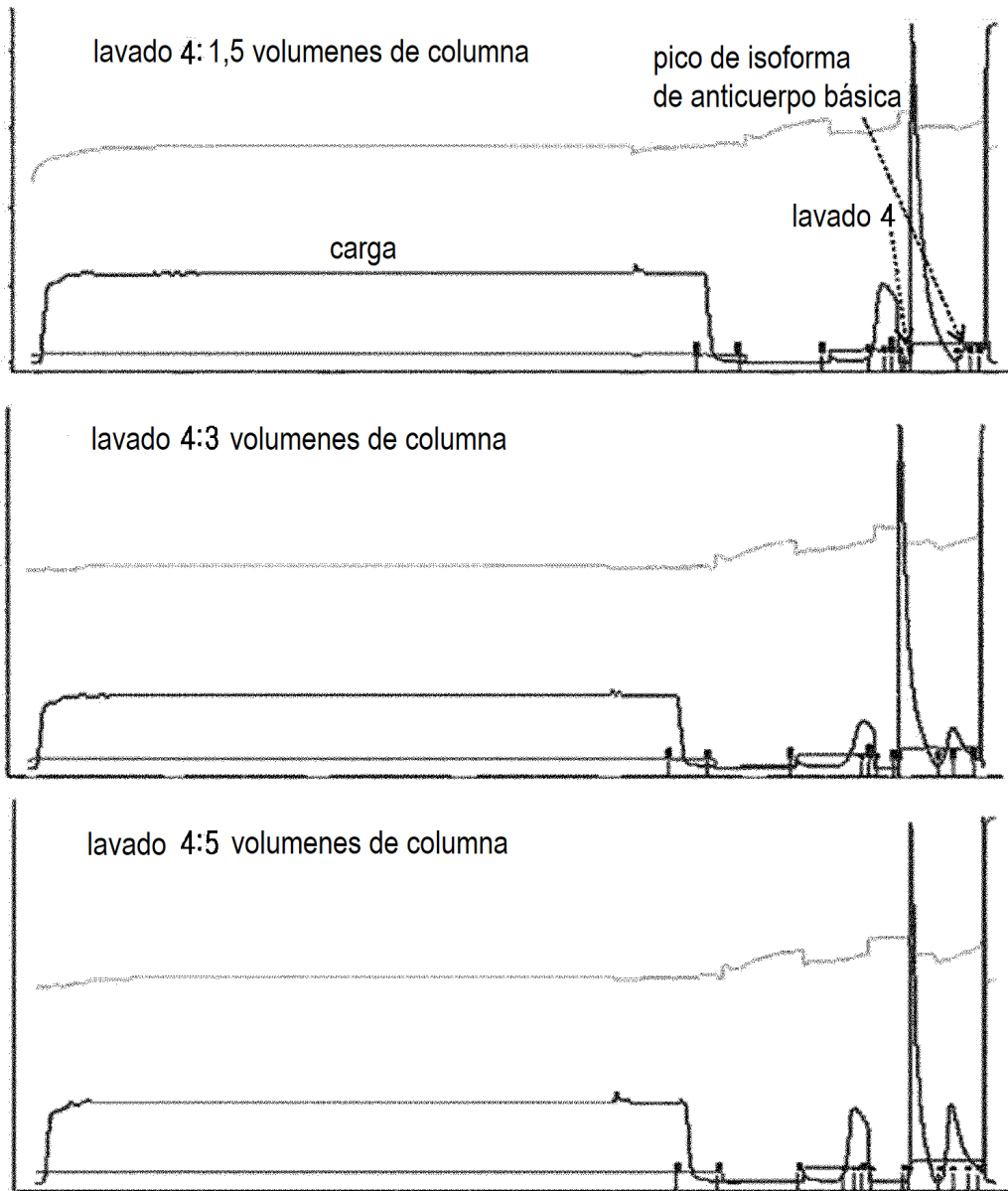


[Fig. 8]

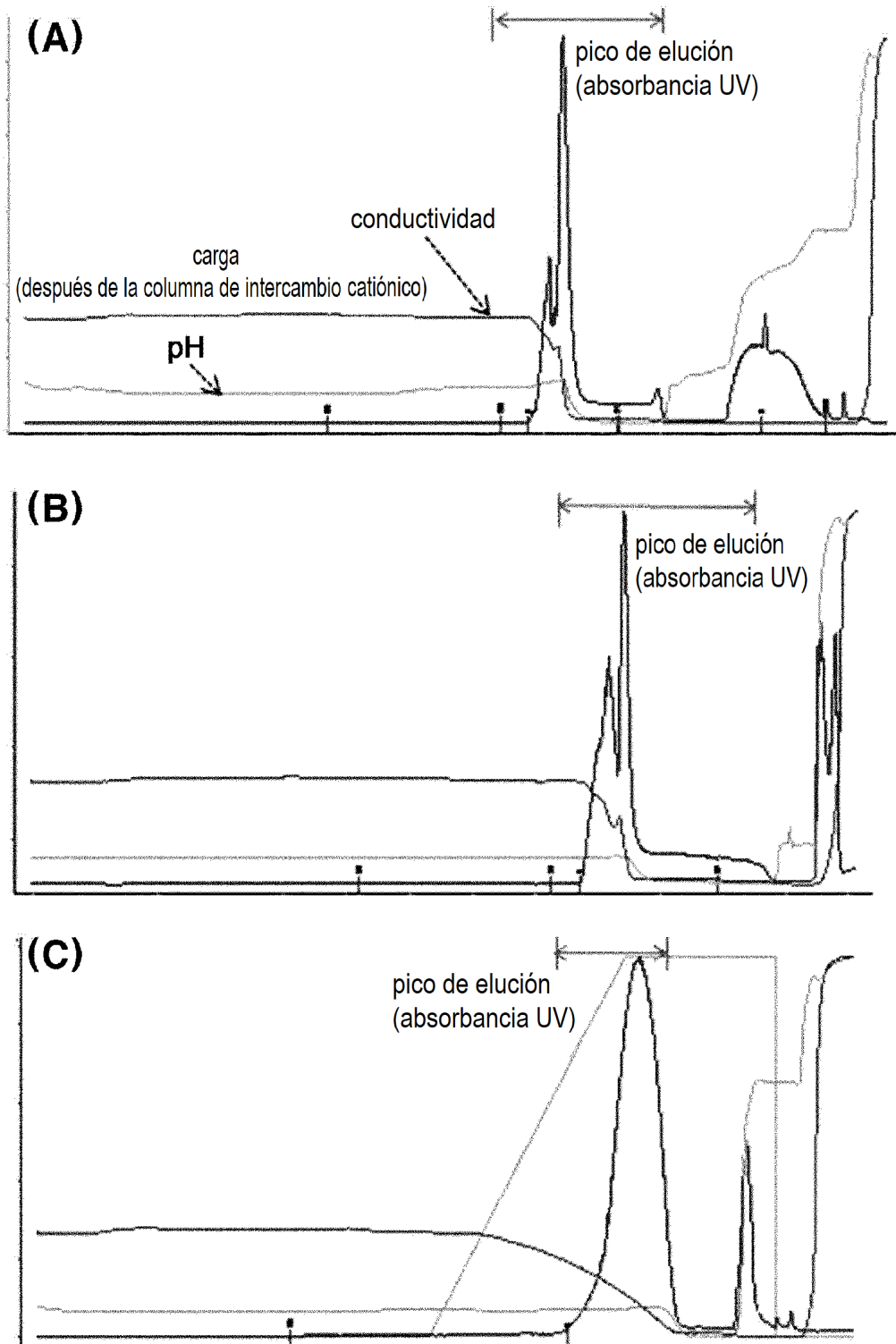




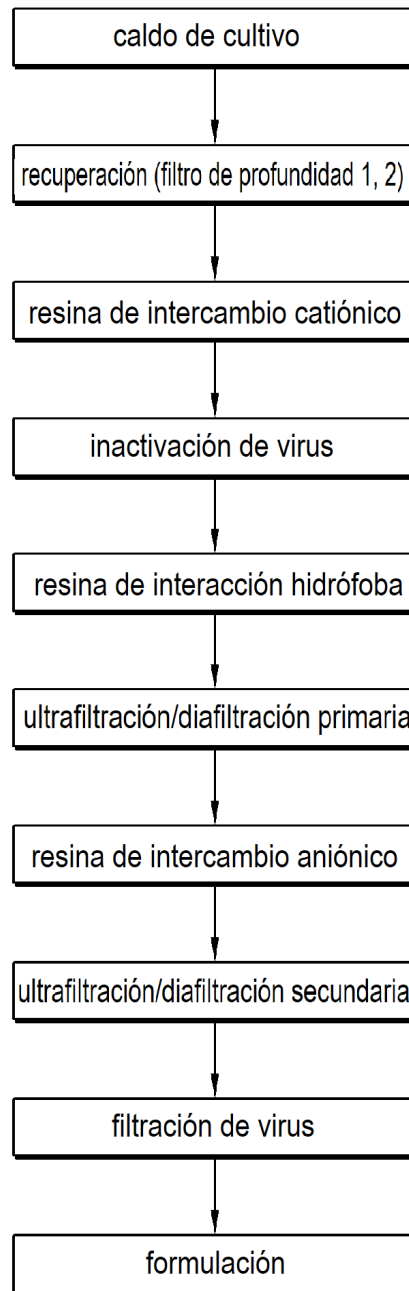
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]

