

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 676**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2012 PCT/US2012/070373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12806322 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2794635**

54 Título: **Cromatografía de membrana de intercambio iónico**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579285 P

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

25.01.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BILL, JEROME JOSEPH JR.;
BROWN, ARICK MICHAEL;
DOWD, CHRISTOPHER JOHN y
THAYER, BROOKE ELLEN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 697 676 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

Cromatografía de membrana de intercambio iónico.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la purificación de anticuerpos. En particular, la invención se refiere a procedimientos para mejorar el rendimiento de etapas de purificación posteriores para eliminar impurezas mediante el uso previo de cromatografía de membrana de intercambio iónico.

10

Antecedentes de la invención

La purificación económica a gran escala de las proteínas es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. En general, las proteínas se producen mediante cultivo celular, usando líneas de células eucariotas o procariotas genomanipuladas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen de esa proteína. Dichas células se deben alimentar con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, habitualmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células con una pureza suficiente para su uso como un fármaco para uso en humanos plantea un desafío formidable.

Los procedimientos para la purificación de proteínas mediante separación de restos celulares dependen inicialmente del mecanismo de expresión de la proteína dada. Algunas proteínas pueden ser secretadas directamente desde la célula hacia los medios de crecimiento circundantes, mientras que otras lo hacen intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un procedimiento de purificación implica la lisis de la célula, lo que se puede hacer mediante una variedad de procedimientos, que incluyen corte mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha ruptura libera todo el contenido de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos se eliminan en general mediante centrifugación diferencial o mediante filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con las proteínas secretadas directamente como consecuencia de la muerte natural de las células y de la liberación de proteínas de las células huésped intracelulares en el transcurso de la producción de proteínas.

Una vez que se ha obtenido una solución clarificada que contiene la proteína de interés sin grandes componentes de restos celulares, su separación de las otras proteínas restantes producidas por la célula se intenta habitualmente usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Dichas técnicas separan las mezclas de proteínas y otras impurezas en función de su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Existen diferentes resinas de cromatografía disponibles para cada una de estas técnicas, permitiendo una adaptación exacta del esquema de purificación a la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos procedimientos de separación es que las proteínas se pueden hacer descender a diferentes velocidades por una columna larga, logrando una separación física que aumenta a medida que van bajando por la columna, o se pueden adherir selectivamente al medio de separación, siendo entonces eluidas o desplazadas de forma diferencial por diferentes disolventes o desplazadores. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo directo". Las publicaciones sobre la purificación de proteínas incluyen Fahrner *et al.*, *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2001; 18:301-27.

Un procedimiento típico de purificación a gran escala para anticuerpos se basa a menudo en el empleo de proteína A inmovilizada como etapa de captura y purificación primaria en combinación con otras operaciones con columna. La proteína A es una proteína de la pared celular *Staphylococcus aureus* con alta afinidad por la región Fc de IgG. Por esta razón, se usa ampliamente para la purificación de IgG. Las operaciones con columna de proteína A brindan, en general, una pureza relacionada con el producto superior a un 98 %, con la mayoría de las impurezas del procedimiento eliminadas en la fracción de flujo continuo. Sin embargo, el uso de la cromatografía de proteína A presenta numerosos inconvenientes. En primer lugar, la unión se realiza en general a pH neutro o ligeramente básico y la elución se suele realizar a pH ácido. Uno de los posibles problemas es que un pH bajo puede desnaturar o desnaturar parcialmente la IgG. Debido a esto y a la alta pureza del producto requerida para aplicaciones clínicas, se requieren etapas adicionales de concentración y purificación para la separación de isómeros relacionados con el producto y la eliminación de las cantidades restantes de proteínas / ADN de células huésped, impurezas de cultivo celular, proteína A lixiviada y virus. Un problema de combinación es que muchas de estas impurezas pueden interferir con la eficacia de las unidades operacionales de procedimientos posteriores para aislar anticuerpos purificados. Otro problema principal es el precio; las columnas de proteína A son mucho más caras que las columnas de intercambio iónico convencionales. Finalmente, hay numerosos escenarios en los que la cromatografía de proteína A no es adecuada o es demasiado costosa, por ejemplo, en la purificación de polipéptidos, moléculas similares a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o anticuerpos completos purificados de ciertos sistemas celulares.

65

Los documentos WO2009135656 A1 y WO2010019148 A1 describen un procedimiento para purificar un anticuerpo mediante cromatografía de membrana de intercambio iónico de desplazamiento. El documento WO9727757 A1 se refiere a la producción de una fracción enriquecida en inmunoglobulina a partir de soluciones en suero mediante cromatografía de intercambio catiónico de sobrecarga.

5 La naturaleza de la presente invención aborda los problemas identificados anteriormente y en sus modos de realización demuestra un procedimiento de purificación alternativo a los actualmente disponibles en la técnica usando una etapa de proteína A en la purificación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y polipéptidos.

10 Sumario de la invención

La invención en el presente documento se refiere a procedimientos para mejorar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende (a) pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio iónico, en la que el polipéptido y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH suficientemente distinto del pI del polipéptido para potenciar la carga del polipéptido y una baja fuerza iónica eficaz para evitar el apantallamiento de las cargas por los iones del tampón, lo que provoca que la membrana se una al polipéptido y a al menos un contaminante, (b) sobrecargar la membrana de intercambio iónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente; (c) recoger una fracción de la membrana de intercambio iónico que comprende el anticuerpo de interés; (d) someter la composición que comprende el anticuerpo a una o más etapa(s) de purificación adicional(es), y (e) recuperar el polipéptido purificado del efluente.

25 En una alternativa, la invención se refiere a un procedimiento para mejorar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende (a) pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio catiónico, en la que el anticuerpo y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del polipéptido y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que provoca que la membrana se una al anticuerpo y al al menos un contaminante, y (b) sobrecargar la membrana de intercambio catiónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente; (c) recoger una fracción de la membrana de intercambio iónico que comprende el anticuerpo de interés; (d) someter la composición que comprende el polipéptido a una o más etapa(s) de purificación adicional(es), y (e) recuperar el polipéptido purificado del efluente.

40 En otra alternativa, la invención se refiere a un procedimiento para mejorar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende (a) pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio aniónico, en la que el anticuerpo y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que provoca que la membrana se una al anticuerpo y al al menos un contaminante, y (b) sobrecargar la membrana de intercambio aniónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente; (c) recoger una fracción de la membrana de intercambio iónico que comprende el polipéptido de interés; someter la composición que comprende el polipéptido a una o más etapa(s) de purificación adicional(es), y (e) recuperar el polipéptido purificado del efluente.

50 En un aspecto, el contaminante es una proteína de ovario de hámster chino (CHOP). En otro aspecto, el contaminante es una proteína de *E. coli* (ECP). En otro aspecto, el contaminante es gentamicina. En otro aspecto más, el contaminante es polietilénimina (PEI).

En un aspecto, el polipéptido comprende una región C_H2/C_H3. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

55 En otros aspectos, los procedimientos comprenden además someter a la composición que comprende el anticuerpo a una o más etapa(s) de purificación adicional(es) antes, durante o bien después de las etapas a a b descritas anteriormente, siendo la etapa de purificación, en una alternativa, una cromatografía de afinidad de unión a Fc (por ejemplo, cromatografía de proteína A) y, en otra alternativa, cromatografía de intercambio iónico, usando una columna o membrana operada en modo de unión/elución, flujo continuo o desplazamiento. En otro aspecto más, la membrana de intercambio iónico se reemplaza por un monolito o filtro de profundidad.

60 Además, la invención proporciona la preparación de una composición farmacéutica combinando el polipéptido purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1. Esquema de purificación de anticuerpo utilizando una membrana CEX para proteger una columna CEX, con o sin una columna de proteína A inicial.
- Figura 2. Esquema de purificación de una molécula distinta de anticuerpo usando una membrana CEX para proteger una columna CEX como etapa inicial.
- 10 Figura 3. Rendimiento para la mezcla de intercambio aniónico de mAb 1 a pH 5,5 y 6,4 mS/cm y a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/hora).
- Figura 4. Rendimiento para la mezcla de intercambio catiónico de mAb 2 a pH 8,0, Mustang™ Q (pequeña escala, 0,35 ml VM, 600 VM/hora).
- 15 Figura 5. Aclaramiento de CHOP para la mezcla de proteína A de mAb 3 a pH 5,5, 3,2 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/hora).
- Figura 6. Eliminación de impurezas después de la sobrecarga con membranas CEX.
- 20 Figura 7. Fuerza de unión a Mustang S de diversas especies según lo determinado por la elución en gradiente y la normalización a la concentración más alta de especies en cada fracción.
- Figura 8. Masa total unida a Mustang S de varias especies, calculada mediante la suma de todas las masas de las fracciones de elución en gradiente y comparada a diferentes densidades de carga de membrana y normalización a la masa máxima.
- 25 Figura 9. Membrana Mustang S cargada con proteína, lavada con tampón acetato 20 mM hasta que la absorbancia UV alcanzó la línea base y, a continuación, eluida con tampón acetato / gentamicina 20 mM para demostrar el desplazamiento del anticuerpo por la gentamicina.
- 30 Figura 10. Esquema que representa el protocolo para determinar la capacidad de unión dinámica (DBC) del anticuerpo en una columna CEX (Fractogel SE Hicap) con o sin la utilización de la membrana CEX a diversas concentraciones de gentamicina.
- 35 Figura 11. Efecto de la concentración de gentamicina sobre la DBC del anticuerpo en una columna Fractogel SE Hicap.
- Figura 12. Comparación de la DBC de la gentamicina en dos membranas CEX (Mustang S y Natrix S).
- 40 Figura 13. DBC del anticuerpo en Fractogel SE Hicap con la mezcla de Natrix S sobrecargada mostrando una mejora de la DBC de un 30 %.
- Figura 14. Efecto del % de PEI utilizado en el procedimiento de extracción sobre la DBC de la proteína en SP Sepharose Fast Flow (SPSFF) que muestra una mejora de 36 a 51 g/l al reducir la cantidad de PEI utilizada.
- 45 Figura 15. Efecto del % de PEI utilizado en el procedimiento de extracción en SPSFF que muestra un rendimiento de etapa reducido y mayores impurezas en la mezcla al aumentar la cantidad de PEI utilizada.
- 50 Figura 16. DBC de proteína, ECP y PEI en Natrix S que muestra ruptura de PEI en la membrana a 330 mg/ml en comparación con la ruptura de proteína y ECP en la membrana a 123 mg/ml.

Descripción detallada del modo de realización preferente

Definiciones:

- 55 En el presente documento, los intervalos numéricos o cantidades precedidos por el término "aproximadamente" incluyen expresamente el intervalo exacto o la cantidad numérica exacta.
- 60 La "composición" que se va a purificar en el presente documento comprende cualquiera de interés y uno o más contaminantes. La composición puede estar "parcialmente purificada" (es decir, haber sido sometida a una o más etapas de purificación, tal como cromatografía de proteína A) o se puede obtener directamente de una célula huésped u organismo que produce el polipéptido (por ejemplo, la composición puede comprender fluido de cultivo celular recogido).
- 65 Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere en general a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. De manera preferente, el polipéptido es una proteína de mamífero,

ejemplos de las cuales incluyen: renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (expresadas y secretadas por linfocitos T normales y reguladas en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Un "contaminante" es un material que es diferente del producto polipeptídico deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de células huésped, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP) o proteínas de *E. coli* (ECP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado, isómero o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componentes antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, estreptomycin, neomicina, kanamicina); o un polímero iónico añadido al proceso de purificación (por ejemplo, polietilimina (PEI), polivinilamina, poliarginina, ácido polivinilsulfónico, ácido poliacrílico), etc.

El término "región C_{H2}/C_{H3}", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de la región Fc de una molécula de inmunoglobulina. En modos de realización preferentes, la región C_{H2}/C_{H3} comprende una región C_{H2} intacta seguida de una región C_{H3} intacta, y lo más preferentemente una región Fc de una inmunoglobulina. Los ejemplos de polipéptidos que contienen regiones C_{H2}/C_{H3} incluyen anticuerpos, inmunoadhesinas y proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de interés fusionado a, o conjugado con, una región C_{H2}/C_{H3}.

En modos de realización preferentes de la invención, el anticuerpo que se va a purificar en el presente documento es un anticuerpo recombinante. Un "anticuerpo recombinante" es uno que se ha producido en una célula huésped que se ha transformado o transfectado con ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o que produce el anticuerpo como resultado de la recombinación homóloga. "Transformación" y "transfección" se usan indistintamente para referirse al proceso de introducción de ácido nucleico en una célula. Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula huésped, o puede existir como un elemento extracromosómico. La "célula huésped" incluye una célula en un cultivo celular *in vitro*, así como una célula dentro de un animal huésped. Los procedimientos para la producción recombinante de polipéptidos se describen en la patente de EE. UU. n.º. 5.534.615, incorporada expresamente en el presente documento como referencia, por ejemplo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que retengan, o se modifiquen para comprender, una región C_{H2}/C_{H3} como se define en el presente documento.

En el presente documento, el anticuerpo se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en dicho mamífero. No obstante, también se contemplan anticuerpos dirigidos frente a antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor, véase la patente de EE. UU. n.º 5.091.178). Si el antígeno es un polipéptido,

puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen los polipéptidos discutidos anteriormente. Las dianas moleculares preferentes para anticuerpos abarcadas por la presente invención incluyen polipéptidos CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER, tales como receptor de EGF (HER1), HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3 que incluye las subunidades a o b de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C, etc. Se pueden usar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de los mismos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Dichas células pueden proceder de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria.

Ejemplos de anticuerpos que se van a purificar en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: Los anticuerpos HER2 incluyen trastuzumab HERCEPTIN® (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992), patente de EE. UU. n.º 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO01/00245); anticuerpos CD20 (véase a continuación); anticuerpos IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993), y publicación internacional n.º WO 95/23865); VEGF o anticuerpos del receptor VEGF que incluyen anticuerpos VEGF madurados por afinidad y/o humanizados tales como el anticuerpo VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim *et al.*, *Growth Factors*, 7:53-64 (1992), publicación internacional n.º WO 96/30046, y documento WO 98/45331 publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos CD11a que incluyen efalizumab (RAPTIVA®) (patente de EE. UU. n.º 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anticuerpos que se unen a IgE incluyendo omalizumab (XOLAIR®) (Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993), y publicación internacional n.º WO 95/19181; patente de EE. UU. n.º 5.714.338, expedida el 3 de febrero de 1998 o patente de EE. UU. n.º 5.091.313, expedida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o solicitud internacional n.º PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio de 1998, patente de EE. UU. n.º 5.714.338); anticuerpos CD18 (patente de EE. UU. n.º 5,622,700, expedida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpos del receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos del factor tisular (TF) (patente europea n.º 0 420 937 B1 otorgada el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos de integrina $\alpha 4-\alpha 7$ (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos de EGFR (por ejemplo, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado, cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos CD3 tales como OKT3 (patente de EE. UU. n.º 4.515.893 expedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos CD25 o Tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (véase la patente de EE. UU. n.º 5,693,762 expedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos CD4 como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos CD52 tales como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-337 (1988)); Anticuerpos del receptor de Fc como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995)); anticuerpos del antígeno carcinoembrionario (CEA) como hMN-14 (Sharkey *et al.*, *Cancer Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 Supp): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a las células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton *et al.*, *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)); anticuerpos CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis *et al.*, *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos Gp11b/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos de VIH tales como PR0542; anticuerpos de hepatitis tales como el anticuerpo Hep B OSTAVIR®; anticuerpo CA 125 OvaRex; anticuerpo de epítipo de GD3 idiopático BEC2; anticuerpo $\alpha \nu \beta 3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo de carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1An humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra gangliósido; anticuerpo anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); anticuerpo de antígeno leucocitario humano (HLA) tal como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti-linfocitos B (Impheron); AcM dirigido a linfocitos B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo Lym-1 tal como Lym -1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo del receptor de BAFF (véase, por ejemplo, el documento WO 02/24909); anticuerpo BR3; anticuerpo Blys tal como belimumab; LYMPHOSTAT-B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticuerpo del receptor de IL-6 tal como atilizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo IL-15 tal como HuMax-II-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo del receptor de quimiocina, tal como un anticuerpo CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millieneum); anticuerpo anti-complemento tal como anticuerpo C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Tenelixerimab (BMS-224818; BMS); anticuerpos CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento

WO00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpos TNF- α incluyendo cA2 o infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), fragmento de anticuerpo TNF- α pegilado tal como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (por ejemplo, PassTNF; Verigen); anticuerpos CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 y epratuzumab I-131, anticuerpo CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Soutwestern), BL22 (NIH) y LympoScan Tc99 (Immunomedics).

Los ejemplos de anticuerpos CD20 incluyen: "C2B8," que ahora se denomina "rituximab" ("RITUXAN®") (patente de EE. UU. n.º 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio [90] designado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) comercialmente disponible de IDEC Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE. UU. n.º 5.736.137; 2B8 depositado en ATCC bajo el número de acceso HB11388 en junio 22 de 1993); IgG2a murina "B1", también denominada "Tositumomab," opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "yodo I131 tositumomab" (BEXXAR™) comercialmente disponible de Corixa (véase también la patente de EE. UU. n.º 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69(2):584-591 (1987)) y variantes del mismo que incluyen 1F5 "con región estructural parcheada" o humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depositado en ATCC con n.º HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (patente de EE. UU. n.º 5,677,180); anticuerpo 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *et al.*); anticuerpo 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo de alta afinidad completamente humano dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de linfocitos B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; documento US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos establecidos en los documentos WO 2004/035607 y US2004/0167319 (Teeling *et al.*); los anticuerpos que tienen cadenas de azúcar unidas a N-glucósido complejas unidas a la región Fc descritos en el documento US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*) tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25 y MB20-11; moléculas de unión a CD20 tales como la serie de anticuerpos AME, por ejemplo, anticuerpos AME 33 como se establece en los documentos WO 2004/103404 y US2005/0025764 (Watkins *et al.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas de unión a CD20 tales como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) o IMMUN-106 (documento US 2003/0219433, Immunomedics); anticuerpos que se unen a CD20, incluyendo Leu-16, 1H4 o 2B8 empobrecidos en epítipo, opcionalmente conjugados con IL-2, como en los documentos US 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr *et al.*); anticuerpo biespecífico que se une a CD22 y CD20, por ejemplo, hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang *et al.*); anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles en International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, en: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.*, *Blood* 92:184 (1998)); conjugado anti-CD20 auristatina E (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); terapia con AcM anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden obtener mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Köhler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se puede obtener por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). En un modo de realización adicional, los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar a partir de colecciones en fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones en fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir colecciones en fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. De forma alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de estirpe germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551

(1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature*, 355:258 (1992).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véanse la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Polypeptides of Immunological Interest*, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se definen en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la colección completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)).

Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadenas ligera o pesada. La misma región estructural se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son comunes para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en influir en la unión a antígeno.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o la región variable de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias y

anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas en fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). En otro modo de realización, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia.

En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales", cuando se usa en la presente solicitud, se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, *Polypeptide Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, donde los epítopos son habitualmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcB), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos están abarcados por esta expresión cuando se usan en el presente documento. Los ejemplos de AcB incluyen aquellos con una cadena dirigida contra un antígeno de célula tumoral y la otra cadena dirigida contra una molécula desencadenante citotóxica tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-linfocitos B malignos (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de la hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión a células neurales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a carcinoma generalizado (AMOC-31)/anti-CD3; AcB con una cadena que se une específicamente a un antígeno tumoral y una cadena que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de ricina, anti-interferón-α (IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcaloide de la vinca; AcB para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); AcB que se pueden usar como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA); AcB para abordar complejos inmunológicos para receptores de superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor Fc (por ejemplo, FcγRI o FcγRIII); AcB para su uso en terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus de herpes simplex (VHS), anti-complejo receptor de linfocitos T:CD3/anti-virus de influenza, anti-FcγR/anti-VIH; AcB para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tal como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; AcB como adyuvantes de vacunas; y AcB como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-P-galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Un "anticuerpo no marcado" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

5 Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende dos regiones de unión a antígeno y una región Fc. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una región Fc funcional.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Quienes necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como en los que se va a prevenir el trastorno.

10 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo purificado como se describe en el presente documento. Esto incluye tanto trastornos o enfermedades crónicas y agudas como las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

15 La frase "cromatografía de intercambio iónico" se refiere a una técnica de separación en la que los compuestos se separan en función de su carga neta. Las moléculas se clasifican como aniones (que tienen una carga negativa) o cationes (que tienen una carga positiva). Algunas moléculas (por ejemplo, polipéptidos) pueden tener grupos tanto aniónicos como catiónicos.

20 Una resina de intercambio iónico o polímero de intercambio iónico es una matriz insoluble (o estructura de soporte), normalmente en forma de perlas pequeñas (1-2 mm de diámetro), fabricada a partir de un sustrato de polímero orgánico. Horie *et al. Pure Appl. Chem.* (2004) Vol. 76, No. 4, pp. 889-906. El material tiene una estructura altamente desarrollada de poros en la superficie, entre los cuales hay sitios con iones fácilmente atrapados y liberados. La captura de iones tiene lugar solo con la liberación simultánea de otros iones; por lo tanto, el proceso se denomina "intercambio iónico". Existen múltiples tipos diferentes de resinas de intercambio iónico que se
25 fabrican para dar preferencia selectivamente a uno o varios tipos diferentes de iones.

La mayoría de las resinas de intercambio iónico típicas se basan en poliestireno reticulado. Los grupos activos requeridos se pueden introducir después de la polimerización, o se pueden usar monómeros sustituidos. Por ejemplo, la reticulación a menudo se logra mediante la adición de un 0,5-25 % de divinilbenceno a estireno en el
30 procedimiento de polimerización. Los polímeros no reticulados se usan solo en raras ocasiones porque son menos estables. La reticulación disminuye la capacidad de intercambio iónico de la resina y prolonga el tiempo necesario para llevar a cabo los procedimientos de intercambio iónico. El tamaño de partícula también influye en los parámetros de la resina; las partículas más pequeñas tienen una superficie exterior más grande, pero causan una mayor pérdida de carga en los procedimientos en columna.

35 Existen cuatro tipos principales de resinas de intercambio iónico que difieren en sus grupos funcionales: fuertemente ácidas (típicamente, grupos de ácido sulfónico, por ejemplo, poliestireno sulfonato de sodio o poliAMPS); fuertemente básicas (grupos amino cuaternarios, por ejemplo, grupos trimetilamonio, por ejemplo, poliAPTAC); débilmente ácidas (principalmente, grupos ácido carboxílico); débilmente básicas (grupos amino primarios, secundarios y/o terciarios, por ejemplo, polietilamina). También hay tipos especializados: resinas quelantes (ácido iminodiacético, tiourea y muchos otros).

40 Una membrana de cromatografía de intercambio iónico se unirá a un compuesto con una carga global positiva o negativa. Los sitios de unión están ubicados a lo largo de los poros del adsorbente. El compuesto se transporta al sitio de unión por convección. Una membrana cargada positivamente (intercambiador aniónico) se unirá a un compuesto con una carga global negativa. Por el contrario, una membrana cargada negativamente (intercambiador catiónico) se unirá a un compuesto con una carga global positiva.

50 Las membranas de intercambio iónico se pueden clasificar adicionalmente como fuertes o débiles. Las membranas de intercambio iónico fuertes están cargadas (ionizadas) en un amplio intervalo de niveles de pH. Las membranas de intercambio iónico débiles están ionizadas en un estrecho intervalo de pH. Las cuatro químicas de intercambio iónico más comunes son:

Tipo de intercambio de iones	Abreviatura común	Grupo funcional
Aniónico fuerte	Q	Amonio cuaternario
Aniónico débil	D	Dietilamina
Catiónico fuerte	S	Ácido sulfónico
Catiónico débil	c	Ácido carboxílico

55 En general, las membranas de intercambio iónico tienen tamaños de poro de 0,1 a 100 µm. Como referencia, Sartobind Q (Sartorius AG) es una membrana de intercambio aniónico fuerte que tiene un tamaño de poro nominal de 3-5 µm y está disponible comercialmente en un formato de capa única o múltiple, y Mustang Q (Pall Corporation) es una membrana de intercambio aniónico fuerte que tiene un tamaño de poro nominal de 0,8 µm y también está disponible comercialmente en un formato de capa única o múltiple. Como otra referencia, Sartobind S
60

(Sartorius AG) es una membrana de intercambio catiónico fuerte que tiene un tamaño de poro nominal de 3-5 μm y está disponible comercialmente en un formato de capa única o múltiple, y Mustang S (Pall Corporation) es una membrana de intercambio catiónico fuerte que tiene un tamaño de poro nominal de 0,8 μm y también está disponible comercialmente en un formato de capa única o múltiple. Como otra referencia, Natrix S (Natrix Separations, Inc.) es una membrana de intercambio catiónico fuerte que comprende un sustrato polimérico duradero altamente fibroso no tejido encapsulado dentro de un hidrogel macroporoso de gran área superficial.

Una evaluación de tamaño de poro "nominal" describe la capacidad de la membrana para retener la mayoría de las partículas a un 60 a 98 % del tamaño de poro evaluado.

El "pH" de una solución mide la acidez o alcalinidad con respecto a la ionización de una muestra de agua. El pH del agua es neutro, es decir, 7. La mayoría de las lecturas de pH oscilan entre 0 y 14. Las soluciones con una $[\text{H}^+]$ mayor que el agua (pH inferior a 7) son ácidas; las soluciones con una $[\text{H}^+]$ menor que el agua (pH mayor que 7) son básicas o alcalinas. El pH se puede medir usando un medidor de pH. El pH del tampón se puede ajustar usando un ácido o una base tal como HCl o NaOH.

El "pI" o "punto isoeléctrico" de una molécula tal como un polipéptido se refiere al pH al que el polipéptido contiene un número igual de cargas positivas y negativas. El pI se puede calcular a partir de la carga neta de los residuos de aminoácido del polipéptido o se puede determinar mediante enfoque isoeléctrico. La naturaleza anfótera de los polipéptidos para tener grupos tanto aniónicos como catiónicos puede ser manipulada. El pH de un polipéptido se puede reducir hasta el punto en que el polipéptido deseado se comporte como un catión (tiene una carga positiva). De forma alternativa, el pH de un polipéptido se puede aumentar hasta el punto en que el polipéptido deseado se comporte como un anión (tiene una carga negativa).

El término "conductividad" hace referencia a la capacidad de una solución de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. La unidad básica de conductividad es siemens (S), anteriormente denominada mho. La conductividad se expresa comúnmente en unidades de mS/cm. Dado que la carga de iones en la solución facilita la conductancia de la corriente eléctrica, la conductividad de una solución es proporcional a su concentración de iones. Ambas medidas se correlacionan bien con la fuerza iónica. La fuerza iónica está estrechamente relacionada con la concentración de electrolitos e indica con qué eficacia la carga de un ion particular es apantallada o estabilizada por otros iones en un electrolito. La principal diferencia entre la fuerza iónica y la concentración de electrolitos es que la primera es más alta si algunos de los iones tienen una carga más alta. Otra diferencia entre los dos es que la fuerza iónica refleja la concentración de iones libres, y no solo la cantidad de sal que se ha añadido a una solución. La conductividad se puede medir usando un medidor de conductividad, tal como varios modelos de medidores de conductividad de Orion. La conductividad de una solución se puede alterar cambiando la concentración de iones que hay en ella. Por ejemplo, la concentración de un agente tampón y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución se pueden alterar para conseguir la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada.

Para la cromatografía de membrana, el "caudal" se describe habitualmente como volúmenes de membrana por hora (VM/h).

Para la cromatografía de membrana, la "densidad de carga" se expresa a menudo como gramos de composición procesada por litro de membrana.

Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Diversos tampones que se pueden emplear dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón se describen en *Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., Ed. Calbiochem Corporation (1975).

"Purificar" un polipéptido de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes significa aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición eliminando (por completo o parcialmente) al menos un contaminante de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un procedimiento de purificación global que da como resultado una composición "homogénea". "Homogénea" se usa en el presente documento para referirse a una composición que comprende al menos aproximadamente un 70 % en peso del anticuerpo de interés, basado en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % en peso, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % en peso, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso.

"Unión" de una molécula a una membrana de intercambio iónico significa exponer la molécula a la membrana de intercambio iónico en condiciones apropiadas (pH y/o conductividad), de modo que la molécula se inmoviliza de forma reversible en o sobre la membrana de intercambio iónico en virtud de interacciones electrostáticas entre la molécula y un grupo cargado o grupos cargados de la membrana de intercambio iónico.

"Lavar" la membrana de intercambio iónico significa pasar un tampón apropiado a través de o sobre la membrana

de intercambio iónico.

"Eluir" una molécula (por ejemplo, anticuerpo o contaminante) de una membrana de intercambio iónico significa eliminar la molécula de la misma.

5 Para la cromatografía de membrana, "flujo continuo" se refiere a la unión de impurezas a la membrana mientras el compuesto no está retenido.

10 Para la cromatografía de membrana, "adsorción competitiva" se refiere a la unión de más de un componente a la membrana en una condición dada.

15 Para la cromatografía de membrana, "cromatografía de sobrecarga" se refiere a promover la adsorción competitiva tanto del compuesto de interés como de las impurezas en la membrana. La membrana se carga más allá de la capacidad de unión de un compuesto. Explotando la fuerza de unión diferencial del compuesto y de las impurezas, en la que la impureza se une más fuertemente, el compuesto se desplaza por las impurezas y desorbe de la membrana y fluye hacia el efluente de la membrana.

20 "Cromatografía de desplazamiento" se refiere a una técnica de cromatografía en la que se coloca una muestra en una columna o membrana y luego se desplaza por un soluto que se adsorbe más fuertemente que los componentes de la mezcla original. El resultado es que los componentes se resuelven en zonas "rectangulares" consecutivas de sustancias puras altamente concentradas en lugar de "picos" separados por disolvente. Tugcu (1994) *Methods in Molecular Biology: Vol 421 Affinity Chromatography: Methods and Protocols* pp 71-89. Se puede obtener una mayor concentración de producto, mayor pureza y mayor rendimiento en comparación con otros modos de cromatografía. La cromatografía de desplazamiento es una técnica eficiente para la purificación de proteínas a partir de mezclas complejas a altas cargas de columna en una variedad de aplicaciones. La cromatografía de desplazamiento es muy adecuada para obtener cantidades de mg de proteínas purificadas a partir de mezclas complejas utilizando columnas de cromatografía analítica estándar a escala de laboratorio. También es particularmente adecuada para enriquecer los componentes traza en la alimentación. La cromatografía de desplazamiento se puede llevar a cabo fácilmente usando una variedad de sistemas de resinas que incluyen intercambio iónico, HIC y RPLC. Freitag y Breier. (1995) *J. Chromatogr. A* 691, 101-112.

35 La frase "modo mixto" se refiere a un sorbente que tiene la capacidad de separar compuestos basándose en dos mecanismos diferentes, por ejemplo, una separación basada en las diferencias de hidrofilia / hidrofobia entre polipéptidos superpuestos en una separación basada en la carga neta. Esto se logra a menudo mediante el uso de un ligando multimodo que puede interactuar con una molécula diana de varias maneras diferentes, que incluyen interacción iónica y enlaces de hidrógeno o interacción hidrofóbica. Sorbentes como Capto™ MMC y Capto™ Adhere de GE Healthcare son ejemplos de resinas de cromatografía de "modo mixto".

40 Un "filtro de profundidad" es una variedad de filtro que utiliza un medio de filtración poroso para retener las partículas en todo el medio, en lugar de solo en la superficie del medio. Estos filtros se usan comúnmente cuando el fluido que se va a filtrar contiene una gran carga de partículas porque, en relación con otros tipos de filtros, pueden retener una gran cantidad de partículas antes de obstruirse.

45 Un "monolito" se refiere a un medio cromatográfico compuesto por un sustrato poroso que ha sido alterado químicamente para una aplicación específica. Los monolitos de intercambio iónico se han desarrollado como una alternativa a la resina cromatográfica, demostrando típicamente una alta permeabilidad y cortas distancias de difusión que resultan en un mejor transporte de masa y presiones más bajas, permitiendo su uso a mayores caudales y/o menores tiempos de residencia.

50 Modos para llevar a cabo la invención

La invención en el presente documento proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo de una composición (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes. La composición es en general una que resulta de la producción recombinante del polipéptido, pero puede ser la que resulta de la producción del polipéptido mediante síntesis peptídica (u otros medios sintéticos) o el polipéptido se puede purificar de una fuente natural del polipéptido. Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido que contiene la región C_H2/C_H3. En modos de realización preferentes, el polipéptido que contiene la región C_H2/C_H3 es un anticuerpo.

60 Producción recombinante de anticuerpos

65 Para la producción recombinante del polipéptido, el ácido nucleico que codifica la secuencia del polipéptido se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el polipéptido se aísla y secuencia fácilmente aplicando procedimientos convencionales (por ejemplo, empleando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en

general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.534.615).

5 Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como bacilos como *B. subtilis* y
10 *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos.

15 Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos o levaduras filamentosos son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más utilizada entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

25 Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos glicosilados derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 del VPN de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del VPN de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar
35 como huéspedes.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, líneas CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, *Annals NY. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y células de hepatoma humano (Hep G2). Con frecuencia, las células CHO son preferentes para la expresión de anticuerpos, y se pueden usar de forma ventajosa para producir los anticuerpos purificados de acuerdo con la presente invención.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptidos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

55 Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de EE. UU. re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato),
60 tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en

concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

5 Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o bien células lisadas (por ejemplo, resultantes de homogeneización), se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

15 Un aspecto de la presente invención considera el impacto de la gentamicina sobre las columnas CEX. La gentamicina, y otros antibióticos aminoglucósidos, se pueden usar como aditivos bactericidas en las aplicaciones de cultivos celulares para evitar contaminaciones no resistentes. Cuando se agrega a un cultivo celular, se debe eliminar como una impureza relacionada con el procedimiento. La eliminación típica se logra usando una etapa de cromatografía de afinidad; sin embargo, en algunos procedimientos, una etapa de afinidad puede no ser la primera etapa de purificación.

20 Como un antibiótico aminoglucósido catiónico, la gentamicina tiene una carga positiva a pH neutro o por debajo este. Si una columna CEX fuera la primera etapa de cromatografía, con la intención de unir el polipéptido de interés a pH neutro o por debajo de este, la gentamicina estaría compitiendo por los sitios de unión en la columna. El trabajo previo ha demostrado que la gentamicina se unirá más fuertemente que un anticuerpo a una membrana o resina CEX. El efecto sobre una columna CEX es una aparente disminución de la capacidad de unión del anticuerpo.

30 Otro aspecto de la presente invención considera el impacto de la polietilimina (PEI), u otros polímeros catiónicos, sobre columnas CEX. La PEI se puede usar como agente de floculación antes de la extracción en procesos de purificación de polipéptidos de *E. coli*. Cuando se agrega PEI después de una etapa de homogeneización celular, actúa como un aglutinante de impurezas y hace que tanto la centrifugación como la filtración sean procedimientos más robustos. Un problema de la incorporación de esta etapa es el efecto de cualquier PEI adicional que no se use para flocular las impurezas, ya que luego permanece en las mezclas de purificación que finalmente entran en contacto con las columnas CEX.

35 Existen muchas formas diferentes de PEI, que van desde polímeros lineales hasta ramificados, y que pueden contener aminos primarias, secundarias o terciarias. La forma de la PEI no es tan preocupante como el hecho de que está cargada positivamente en la mayoría de las condiciones de procesamiento. Por lo tanto, se unirá a una columna CEX con mucha fuerza. Además, la primera etapa de cromatografía para la mayoría de las proteínas de *E. coli* puede ser una columna CEX, debido a su capacidad de unión relativamente alta. Además, debido a la fuerte unión de la columna CEX a la PEI, en ocasiones se requiere el uso de una columna CEX más débil para que la PEI pueda eluirse de la columna después de cada ejecución.

45 El trabajo previo ha demostrado que, cuando se usan niveles variables de PEI para la floculación, la capacidad de unión de la columna CEX aumenta a medida que se usan niveles más bajos de PEI. También se ha observado que el rendimiento de la etapa de cromatografía CEX aumentará con niveles más bajos de PEI en la carga.

50 El uso de una membrana de intercambio iónico cargada de manera similar antes de una columna de intercambio iónico para reducir las impurezas puede dar como resultado un aumento de la capacidad de unión, el rendimiento, la eliminación de impurezas, todo lo cual puede permitir un proceso más eficiente y unos costes operativos reducidos.

El procedimiento de cromatografía de intercambio iónico de membrana de la invención

55 En el modo de realización preferente de la invención, la composición que va a ser sometida al procedimiento de purificación en el presente documento es un polipéptido producido de forma recombinante, preferentemente un anticuerpo intacto, expresado por un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) o de células huésped recombinantes de *E. coli*. Opcionalmente, la composición se ha sometido a al menos una etapa de purificación antes de la cromatografía de intercambio iónico de membrana. La composición contiene el polipéptido de interés y uno o más contaminantes, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP); proteínas de *E. coli* (ECP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componentes antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina); o un polímero iónico añadido al procedimiento de purificación (por ejemplo, polietilimina (PEI), polivinilamina, poliarginina, ácido polivinilsulfónico, ácido poliacrílico), etc.

65 Ejemplos de procedimientos de purificación adicionales que se pueden realizar antes, durante o después del

procedimiento de cromatografía de intercambio iónico de membrana incluyen fraccionamiento en una cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, en PHENYL-SEPHAROSE™), precipitación con etanol, precipitación térmica, precipitación en polietilenglicol (PEG), enfoque isoeléctrico, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en HEPARIN SEPHAROSE™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, intercambio iónico en modo mixto, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de inducción por carga hidrófila, filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF) y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A, proteína G, un anticuerpo o un sustrato, ligando o antígeno específico como reactivo de captura).

Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o bien fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido se secreta al medio, las células huésped recombinantes se pueden separar del medio de cultivo celular mediante centrifugación o filtración, por ejemplo.

En el caso de anticuerpos aislantes, la mayoría de la purificación se produce durante la cromatografía de afinidad de proteína A, si se usa como primera etapa. La proteína A es una proteína de la pared celular bacteriana que se une específicamente a la región Fc de los anticuerpos. Cuando se inmoviliza en medios de cromatografía, la proteína A proporciona una técnica para purificar anticuerpos recombinantes porque puede unirse selectivamente a anticuerpos en soluciones complejas, permitiendo el flujo de impurezas.

El protocolo básico de la columna de afinidad de proteína A es sencillo: se unen a pH neutro y eluyen a pH ácido. La proteína A inmovilizada sobre una fase sólida se usa para purificar el polipéptido que contiene la región C_{H2}/C_{H3}. La fase sólida es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio, sílice, agarosa o poliestirenodivinilbenceno para inmovilizar la proteína A. Preferentemente, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado, una columna de ácido silícico o una columna de agarosa altamente reticulada. Una columna Mabelect SuRe™, disponible comercialmente de GE Healthcare, es un ejemplo de una columna de proteína A de agarosa altamente reticulada que es efectiva para purificar anticuerpos. En algunas ocasiones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de evitar la adherencia inespecífica a la columna. La columna PROSEP A™, comercialmente disponible de Millipore Corporation, es un ejemplo de una columna de vidrio de poro controlado con proteína A que está recubierta con glicerol. La fase sólida para la cromatografía de proteína A se equilibra con un tampón adecuado.

La preparación contaminada derivada de las células huésped recombinantes se carga en la fase sólida equilibrada usando un tampón de carga que puede ser el mismo que el tampón de equilibrado. A medida que la preparación contaminada fluye a través de la fase sólida, el polipéptido se adsorbe en la proteína A inmovilizada y otros contaminantes (como proteínas de ovario de hámster chino, CHOP, cuando el polipéptido se produce en una célula CHO, gentamicina y polietilénimina (PEI)) se unen de forma no específica a la fase sólida.

La siguiente etapa realizada secuencialmente implica eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida lavando la fase sólida con una solución que contiene una sal, un aminoácido y/o un disolvente de electrolito hidrófobo en una etapa de lavado intermedia. En modos de realización preferentes, la sal en este lavado es fosfato de potasio, el aminoácido es arginina, y el electrolito hidrófobo es TEMAC y/o TEAC. Mientras que un único soluto puede estar presente en el lavado, en determinados modos de realización se pueden usar dos o más de dichos solutos. El(los) soluto(s) se añade(n) preferentemente a una solución de pH tamponado que tiene un pH aproximadamente neutro.

Después de la etapa de lavado intermedia del párrafo precedente, el polipéptido de interés se recupera de la columna. Esto se logra normalmente usando un tampón de elución adecuado. El polipéptido puede, por ejemplo, eluirse de la columna usando un tampón de elución que tiene un pH bajo, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5. Los ejemplos de tampones de elución para este fin incluyen tampones de citrato o acetato.

La cromatografía de intercambio iónico de membrana se realiza como se reivindica en el presente documento. Primero se toma una decisión sobre si se va a emplear una membrana de intercambio aniónico o catiónico. Aunque el punto isoeléctrico (pI) de algunos anticuerpos varía de aproximadamente 6,7 a 9,4, el pI de muchos anticuerpos es alto (a menudo >8 y a veces >9). En general, una membrana de intercambio catiónico se puede usar para anticuerpos con pI superior a aproximadamente 8, y una membrana de intercambio aniónico se puede usar para anticuerpos con pI inferior a aproximadamente 8.

Para la cromatografía de intercambio catiónico de membrana ejecutada en modo de sobrecarga, el pH del material de carga se ajusta aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo, la conductividad del material de carga se ajusta a ≤ aproximadamente 40 mS/cm, dependiendo en el pH, y el anticuerpo se bombea a través de la membrana. En algunos modos de realización, el pH del material de carga se ajusta aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH, o aproximadamente 1 unidad de pH

por debajo del pI del anticuerpo. En otros modos de realización, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 20 mS/cm o \leq aproximadamente 10 mS/cm, dependiendo del pH. Debido a que el pH de la carga es inferior al pI del anticuerpo, el anticuerpo (que ahora está cargado positivamente) NO fluirá inicialmente. Por el contrario, el anticuerpo se unirá electrostáticamente a los grupos funcionales negativos del intercambiador de cationes. Esto se debe a que el anticuerpo (positivo) y la membrana (negativa) tienen carga opuesta. Dado que el pI de muchos contaminantes, por ejemplo, proteínas de células huésped tales como CHOP o ECP, antibióticos aminoglucósidos tales como gentamicina y aditivos de polímeros iónicos tales como polietilimina (PEI), que eluyen con el anticuerpo durante la cromatografía de afinidad de proteína A es solo ligeramente diferente del pI del anticuerpo, es decir, el pI pueden diferir en solo aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 unidades de pI, estos contaminantes, como los anticuerpos "básicos", también se unirán a la membrana. En los esquemas de purificación en los que no se utiliza la cromatografía de proteína A, la gentamicina o la PEI u otras impurezas permanecerán en concentraciones suficientemente altas para reducir el rendimiento de una columna IEX a menos que se use una membrana. Sin estar limitado a ninguna teoría, parece que en la cromatografía de intercambio catiónico de membrana que se ejecuta en modo de sobrecarga, en condiciones de pH y conductividad que inducen carga con apantallamiento iónico mínimo, se produce adsorción competitiva y los contaminantes se unen preferentemente a la membrana o de otro modo "desplazan" efectivamente el anticuerpo de la membrana (RR Drager, FE Regnier, *J Chromatogr.* 359:147-55 (1986)), permitiendo que el anticuerpo "eluya" de la matriz o fluya tras la unión y se recupere en el efluente.

Para la cromatografía de intercambio aniónico de membrana ejecutada en modo de sobrecarga, el pH del material de carga se ajusta aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 40 mS/cm, dependiendo en el pH, y el anticuerpo se bombea a través de la membrana. En algunos modos de realización, el pH del material de carga se ajusta aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH, o aproximadamente 1 unidad de pH por encima del pI del anticuerpo. En otros modos de realización, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 20 mS/cm o \leq aproximadamente 10 mS/cm, dependiendo del pH. Debido a que el pH de la carga es superior al pI del anticuerpo, el anticuerpo (que ahora está cargado negativamente) NO fluirá inicialmente. Por el contrario, el anticuerpo se unirá electrostáticamente a los grupos funcionales positivos del intercambiador de aniones. Esto se debe a que el anticuerpo (negativo) y la membrana (positiva) tienen carga opuesta. Dado que el pI de muchos contaminantes, por ejemplo, proteínas de células huésped tales como CHOP, que eluyen con el anticuerpo durante la cromatografía de afinidad de proteína A es solo ligeramente diferente del pI del anticuerpo, es decir, el pI pueden diferir en solo aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 unidades de pI, estos contaminantes, como los anticuerpos "ácidos", también se unirán a la membrana. Sin estar limitado a ninguna teoría, parece que en la cromatografía de intercambio aniónico de membrana que se ejecuta en modo de sobrecarga, en condiciones de pH y conductividad que inducen carga con apantallamiento iónico mínimo, se produce adsorción competitiva y los contaminantes se unen preferentemente a la membrana o de otro modo "desplazan" efectivamente el anticuerpo de la membrana (RR Drager, FE Regnier, *J Chromatogr.* 359:147-55 (1986)), permitiendo que el anticuerpo "eluya" de la matriz o fluya tras la unión y se recupere en el efluente.

En un ejemplo, la cromatografía de membrana se ejecuta en un sistema de cromatografía estándar o en un sistema de cromatografía personalizado como un AKTA™ Explorer (GE Healthcare) equipado con manómetros, sensores y controladores de bomba más bomba. En este ejemplo, el dispositivo de membrana se instala en una posición posterior a un manómetro. En dicho ejemplo, los detectores de pH y de conductividad se instalan en una posición posterior al dispositivo de membrana. Continuando con este ejemplo, el sistema se lava abundantemente con agua y luego con tampón de equilibrado antes de la instalación de la membrana. Continuando con el ejemplo, el sistema con la membrana se lava con tampón de equilibrado hasta que el pH de la solución y la salida de conductividad coinciden con la especificación del tampón de equilibrado (aproximadamente cinco volúmenes de membrana) y se observa una línea base estable. Continuando aún más con este ejemplo, el material de alimentación se carga con una bomba a 333-2667 VM/hora, pH 5,5 (para la purificación de un anticuerpo "básico" hipotético) o pH 8,0 (para la purificación de un anticuerpo "ácido" hipotético) y una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm. Continuando aún más con este ejemplo, se registran la contrapresión de operación y los cambios de pH y conductividad durante la operación. Finalmente, en este ejemplo, el polipéptido en el efluente de la membrana se recoge inmediatamente cuando una traza de absorbancia ultravioleta (UV) a 280 nm es 0,2 unidades de absorbancia superior al nivel de base. Después de cargar el material de alimentación, la membrana se lava con un tampón de lavado apropiado y la recogida se detiene una vez que la traza UV a 280 nm es inferior a 0,2 unidades de absorbancia, y en las muestras de la fracción de efluente de la membrana se analizan la concentración de polipéptido, el nivel de dímero/agregación, las proteínas y el ADN de células huésped y la proteína A lixiviada. La etapa de recuperación se calcula típicamente usando el polipéptido cargado y el polipéptido en el efluente de la membrana. La membrana es tradicionalmente de un solo uso. Con respecto a los ensayos analíticos, el contenido de polipéptido (concentración de polipéptido) se puede determinar por la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro Beckman. La agregación polipeptídica se puede determinar mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los niveles de proteína de células huésped, por ejemplo, CHOP o ECP, se pueden analizar mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). El ADN de las células huésped se puede cuantificar mediante el empleo de PCR TaqMAN (reacción en cadena de la polimerasa). La proteína A lixiviada se puede evaluar usando el procedimiento inmunoquímico basado en ELISA recomendado por el vendedor de resina de proteína A. La

gentamicina se puede analizar mediante ELISA y los niveles de polietilimina (PEI) se pueden cuantificar mediante cromatografía Q Sepharose Fast Flow o resonancia magnética nuclear (RMN).

Los siguientes tampones están hipotéticamente diseñados y probados para su uso con la membrana S: (1) ácido acético 89 mM, base TRIS 127 mM, ácido cítrico 21 mM, pH 5,5, 6,0 mS/cm, (2) MES 28 mM, NaCl 95 mM, pH 6,0, 11 mS/cm, (3) NaOAc 200 mM, pH 5,5, 12 mS/cm, (4) NaOAc 100 mM, pH 5,5, 6,4 mS/cm, (5) ácido acético 96 mM, TRIS 65 mM, pH 5,0, 3,6 mS/cm, (6) MOPS 25 mM, pH 7,1, 0,8 mS/cm, (7) HEPES 50 mM, NaCl 90 mM, pH 7,0, 10 mS/cm, (8) solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,5x, ácido acético 4,5 mM, pH 5,0, 8,0 mS/cm, NaOAc 25 mM, pH 5,0, 6,0 mS/cm.

Los siguientes tampones están hipotéticamente diseñados y probados para su uso con la membrana Q: (1) TRIS 50 mM, NaCl 15 mM, pH 8,0, 4,3 mS/cm, (2) TRIS 25 mM, pH 8,0, 1,3 mS/cm, (3) TRIS 60 mM, NaCl 118 mM, pH 8,0, 15,7 mS/cm, (4) TRIS 50 mM, NaOAc 50 mM, pH 8,0, 7,0 mS/cm, (5) HEPES 25 mM, NaOAc 85 mM, pH 7,0, 6,5 mS/cm, y (6) ácido acético 91 mM, TRIS 130 mM, pH 8,0, 5,0 mS/cm, (7) glicina 75 mM, ácido fosfórico 9 mM, TRIS 115 mM, pH 8,9, 0,8 mS/cm (8) TRIS 25 mM, NaCl 5 mM, pH 8,9, 1,0 mS/cm. (9) TRIS 25 mM, NaCl 10 mM, pH 9,0, 1,5 mS/cm, (10) solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x, pH 7,3, 15,2 mS/cm.

Además, el pH de cualquier sistema de tampón se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo con la adición de ácido acético, ácido cítrico, HEPES, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, hidróxido de sodio, TRIS u otros tampones ácidos y básicos para alcanzar un pH adecuado. La conductividad de cualquier sistema de tampón también se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo usando agua purificada, agua para inyección (WFI), acetato de sodio, cloruro de sodio, fosfato de potasio u otros tampones que contienen alto o bajo contenido de sal para alcanzar una conductividad adecuada.

El desarrollo de la etapa de cromatografía de membrana de adsorción competitiva implica pasar el material de carga a través de la membrana a diversos niveles de pH y conductividad. La retención del polipéptido, ya sea polipéptido de interés o contaminante, se puede potenciar cuando la molécula tiene una gran interacción electrostática. Las interacciones electrostáticas se pueden potenciar cuando se trabaja en condiciones en las que los polipéptidos están altamente cargados, es decir, cuando se usa un tampón que tiene un pH suficientemente distinto del pI del polipéptido, potenciando la carga del polipéptido, y una baja fuerza iónica para evitar el apantallamiento de las cargas por los iones del tampón. Por el contrario, las interacciones electrostáticas se pueden reducir cuando se trabaja en condiciones en las que los polipéptidos están poco cargados, es decir, cuando se usa un tampón que tiene un pH suficientemente próximo al pI del polipéptido, reduciendo la carga del polipéptido, y una alta fuerza iónica para permitir el apantallamiento de las cargas por los iones del tampón. Como resultado, los polipéptidos que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas se pueden separar mediante adsorción de membrana optimizando la solución tampón. Algunas moléculas se pueden retener en una membrana determinada, mientras que otras fluyen a través basándose en la selección apropiada del pH y la fuerza iónica del tampón.

La preparación de polipéptido obtenida de acuerdo con el procedimiento de cromatografía de intercambio iónico de membrana del presente documento se puede someter a etapas de purificación adicionales, si es necesario. Ejemplos de etapas de purificación adicionales se han discutido anteriormente.

Con referencia a la Figura 1, un ejemplo de un esquema de purificación exitoso para un anticuerpo es un procedimiento de recuperación que implica una etapa de captura inicial de cromatografía de afinidad de proteína A, seguida la ejecución de una columna de intercambio catiónico en modo de unión y elución, seguida de una etapa o etapas de acabado final.

Con referencia a la Figura 1, un ejemplo de un esquema de purificación mejorado es un procedimiento de recuperación que implica una etapa de captura inicial de cromatografía de afinidad de proteína A, seguida de la ejecución de una membrana de intercambio catiónico en modo de sobrecarga que protege la ejecución de una columna de intercambio catiónico en modo de unión y elución, seguida de una etapa o etapas de acabado final.

Con referencia a la Figura 1, otro ejemplo de un esquema de purificación mejorado es un procedimiento de recuperación que implica la ejecución inicial de una membrana de intercambio catiónico en modo de sobrecarga que protege la ejecución de una columna de intercambio catiónico en modo de unión y elución, seguida de una etapa o etapas de acabado.

Con referencia a la Figura 2, un ejemplo de un esquema de purificación exitoso para una molécula distinta de un anticuerpo es un procedimiento de recuperación que implica una etapa de captura inicial de cromatografía de intercambio catiónico, seguida de una etapa o etapas de acabado final.

Con referencia a la Figura 2, un ejemplo de un esquema de purificación mejorado es un procedimiento de recuperación que implica la ejecución inicial de una membrana de intercambio catiónico en modo de sobrecarga que protege la ejecución de una columna de intercambio catiónico en modo de unión y elución, seguida de una etapa o etapas de acabado.

A diferencia de las aplicaciones que usan las membranas IEX principalmente como una única etapa de purificación o una etapa de acabado final, las membranas del presente procedimiento de purificación se utilizan para proteger una membrana de intercambio iónico con una carga similar (por ejemplo, una membrana de intercambio catiónico colocada directamente delante de una resina de intercambio catiónico). Esto es beneficioso porque las membranas son más selectivas para las impurezas que los polipéptidos/anticuerpos, por lo que reducen o eliminan las impurezas que van a la columna. Las impurezas también pueden desplazar el polipéptido/anticuerpo de manera que eventualmente pase por la columna. Las membranas se pueden usar de forma continua o no continua con la columna mencionada anteriormente.

Usar las membranas antes de la columna de intercambio iónico con carga similar en este procedimiento de purificación puede ser ventajoso siempre que las impurezas en la carga estén disminuyendo el rendimiento de la columna de intercambio catiónico. Eliminar dichas impurezas con la membrana puede permitir que la columna de intercambio catiónico se cargue a una mayor capacidad de unión, lo que da como resultado un tamaño de columna reducido o un número reducido de ciclos por ejecución. De forma alternativa, eliminar dichas impurezas con una membrana puede permitir que la columna de intercambio catiónico tenga un rendimiento de etapa incrementado, o tenga una vida útil de resina más larga antes de ser descartada, o resulte en niveles de impurezas reducidos en la mezcla de intercambio catiónico, o disminuya el número de etapas de acabado posteriores. También puede permitir que una columna de intercambio catiónico reemplace a una columna de afinidad de proteína A, algo que puede ser ventajoso si se necesitara una alternativa más barata que la resina de afinidad de proteína A, o si el polipéptido de interés no se uniría a una resina de afinidad de proteína A. El uso de una membrana de intercambio catiónico y una columna de intercambio catiónico en funcionamiento continuo puede ser ventajoso al reducir el tiempo de procesamiento total, los tampones o equipos tales como tanques o plataformas de bombeo de cromatografía.

Opcionalmente, el polipéptido se conjuga con una o más moléculas heterólogas según se desee. La molécula heteróloga puede ser, por ejemplo, una que aumente la semivida en suero del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, PEG), o puede ser un marcador (por ejemplo, una enzima, marcador fluorescente y/o radionúclido) o una molécula citotóxica (por ejemplo, una toxina, un fármaco quimioterápico o un isótopo radioactivo, etc.).

Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido, opcionalmente conjugado con una molécula heteróloga, se puede preparar mezclando el polipéptido que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. ed. (1980).

La formulación que se va a usar para su administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno y acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

El polipéptido purificado como se divulga en el presente documento o la composición que comprende el polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable se usa a continuación para diversos usos diagnósticos, terapéuticos u otros conocidos para dichos polipéptidos y composiciones. Por ejemplo, el polipéptido se puede usar para tratar un trastorno en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido al mamífero.

5 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

EJEMPLOS

10 **Ejemplo 1**

Introducción

15 Este estudio se centra en la purificación de anticuerpos monoclonales utilizando membranas de intercambio iónico en modo de adsorción competitiva para potenciar la eficiencia de las columnas posteriores. Dado que las membranas que operan en modo de adsorción competitiva se unen a muchas impurezas más fuertemente que los anticuerpos monoclonales u otros polipéptidos de interés, la membrana elimina eficazmente las impurezas que pueden tener un efecto perjudicial sobre una columna posterior con carga similar.

20 Este enfoque es contrario a la intuición de muchos procedimientos de purificación que intentan eliminar las etapas de purificación de intercambio catiónico o aniónico redundantes. En esta solicitud, el uso redundante de una membrana antes de una columna posterior puede potenciar el rendimiento de la columna de manera que el procedimiento global sea más eficiente.

25 Se seleccionaron un mAb derivado de ADN recombinante, un anticuerpo de una sola cadena derivado de ADN recombinante y un polipéptido derivado de ADN recombinante para el análisis basado en su variedad molecular. El mAb se había producido en cultivos de células CHO y tenía grados variables de purificación que iban desde la no purificación cromatográfica hasta tres etapas de cromatografía en columna (proteína A, intercambio aniónico e intercambio catiónico). El anticuerpo de una sola cadena se había producido en cultivos celulares de *E. coli* y se había purificado mediante una etapa de cromatografía de proteína A. El polipéptido se había producido en cultivos celulares de *E. coli* y no se había sometido a purificación previa por cromatografía. Los flujos de alimentación se eligieron en función de los niveles residuales de impurezas que podrían afectar negativamente a una columna de cromatografía.

35 Este estudio explora la capacidad de las impurezas, como gentamicina y polietilenimina (PEI), de afectar negativamente a las columnas de intercambio iónico y la capacidad de las membranas de intercambio iónico, como Mustang™ S y Natrix S, de eliminar dichas impurezas y mejorar el rendimiento de la columna.

Materiales y procedimientos

40 **Flujo de alimentación**

45 Los flujos de alimentación se obtuvieron de lotes de cultivos celulares industriales, piloto o a pequeña escala (Genentech Inc., South San Francisco, California) producidos inicialmente con fines comerciales o de investigación. Los flujos de alimentación tenían grados variables de purificación, lo que significa que se separaron las células y el fluido clarificado se purificó o no en al menos una etapa de cromatografía en columna. Cada flujo de alimentación contenía un polipéptido terapéutico diana y un nivel cuantificable de impurezas. La composición de cada flujo de alimentación varió dependiendo del procesamiento previo del polipéptido individual y del nivel de purificación. La tabla 1 muestra las características del flujo de alimentación para cada uno de los anticuerpos, polipéptidos o anticuerpos monovalentes usados en este estudio.

Tabla 1: Características del flujo de alimentación.

Producto ^a	Tipo de molécula	Procesamiento previo	Nomenclatura	pH	Cond. (mS/cm)	Conc. (g/l)	Tipo de IgG	Masa molecular (kDa)	pI ^c
MAb 1	Anticuerpo monoclonal	Proteína A, intercambio aniónico, flujo continuo	Mezcla de intercambio aniónico	8,0	5,0	5,4	1	144	9,3
MAb 2	Anticuerpo monoclonal	Proteína A, intercambio catiónico, unión/elución	Mezcla de intercambio catiónico	5,5	9,0	4,1	1	145	7,7
MAb 3	Anticuerpo	Centrifugación	Concentrado (HCCF)	7,6	10,5	1,2-1,4			

	monoclonal	Proteína A ^b Proteína A, intercambio aniónico, flujo continuo ^b Proteína A, intercambio aniónico, intercambio catiónico, UF/DF	Mezcla de proteína A Mezcla de intercambio aniónico Mezcla UF/DF	5,5 5,5 6,2	3,2 6,0 4,2	5,9-6,9 4,8 31,6	1 149	8,9	
Anticuerpo monovalente 1	Anticuerpo monovalente	Extracción, acondicionamiento PEI, centrifugación, proteína A	Mezcla de proteína A	6,7	2,5	4,7	N/A	97	8,3
Polipéptido 1	Polipéptido	Extracción, acondicionamiento PEI, centrifugación	Concentrado	7,0	8,0	6,6-7,5	N/A	60	9,1

^a Se tomaron muestras de materias primas para todos los productos obtenidos de procedimientos industriales, piloto y a pequeña escala.

^b El pH y la conductividad de la mezcla se han ajustado previamente para garantizar la estabilidad adecuada del producto.

^c El punto isoeléctrico (pI) se calculó basándose en la secuencia de aminoácidos para cada mAb.

Quantificación de polipéptido

La concentración de polipéptido se determinó usando tres procedimientos. Cuando los niveles de impurezas eran demasiado bajos para tener un efecto apreciable sobre la absorbancia UV, se usó un barrido espectrofotométrico UV a 280 y 320 nm. Cuando los niveles de impurezas o el color podían tener un efecto apreciable sobre la absorbancia UV, se usó una columna analítica de afinidad o de intercambio iónico para cuantificar las concentraciones de anticuerpo o polipéptido, respectivamente.

En el caso de las muestras analizadas mediante barrido espectrofotométrico UV, las muestras que contenían el polipéptido se diluyeron con un diluyente no interferente apropiado en el intervalo de 0,1 a 1,0 UA. La preparación de la muestra y las lecturas del barrido UV se realizaron por duplicado y se registró el valor promedio. El coeficiente de absorción para los polipéptidos probados fue de 1,45-1,70 (mg/ml)⁻¹·cm⁻¹. La absorbancia a 280 y 320 nm, el factor de dilución, el tamaño de la cubeta (1 cm) y el coeficiente de extinción de la absorción se usaron para calcular la concentración de mAb usando la ecuación conocida como Ley de Beer-Lambert.

$$\text{Concentración de proteína (mg/ml)} = \frac{A_{280} - A_{320}}{\text{coef. abs.}} \times \text{factor de dilución}$$

En el caso de las muestras analizadas mediante columnas analíticas de afinidad, las muestras que contenían el anticuerpo se diluyeron con un diluyente no interferente apropiado, en caso necesario, en el intervalo de 0,025-4,0 mg/ml. De forma alternativa, el volumen de inyección podía duplicarse o reducirse a la mitad para muestras de concentración menor o mayor, respectivamente. La preparación de la muestra y el ensayo de HPLC se realizaron por duplicado y se registró el valor promedio. Como un ensayo de HPLC de anticuerpo genérico, los resultados de la concentración de muestra se corrigen para el anticuerpo específico usando el coeficiente de extinción de absorción correspondiente con respecto al coeficiente de extinción de absorción de anticuerpo del material de referencia.

En el caso de las muestras analizadas mediante columna analítica de intercambio iónico, las muestras que contenían el polipéptido se diluyeron con un diluyente no interferente apropiado, en caso necesario, en el intervalo de 0,1-0,8 mg/ml. La preparación de la muestra y el ensayo de HPLC se realizaron por duplicado y se registró el valor promedio. Los resultados de la concentración de muestra se determinan integrando el área bajo el pico de inyección y se correlacionan con una curva estándar usando material de referencia.

Cuantificación de proteínas de células huésped CHO (CHOP)

Se utilizó un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para cuantificar los niveles de CHOP. Se inmovilizaron anticuerpos anti-CHOP de cabra purificados por afinidad sobre pocillos de placas de microvaloración. Las diluciones de las muestras que contenían CHOP, patrones y controles se incubaron en los pocillos, seguido de incubación con anticuerpos anti-CHOP de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se detectó con diclorhidrato de o-fenilendiamina. Se cuantificó la CHOP mediante lectura de absorbancia a 492 nm en un lector de placas de microvaloración. Se usó un programa informático de ajuste de curvas para generar la curva patrón y calcular automáticamente la concentración de la muestra. El intervalo de ensayo para el ELISA fue típicamente de 5 ng/ml a 320 ng/ml. Para cada muestra se analizaron 2-4 diluciones y se promediaron los valores. Los valores de CHOP se dividieron por la concentración de proteína y los resultados se notificaron en unidades de ppm (ng de CHOP/mg de proteína).

Cuantificación de proteínas de E. coli (ECP)

Se utilizó un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para cuantificar los niveles de ECP de manera similar a la cuantificación de CHOP.

Cuantificación de gentamicina

Se utilizó un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para cuantificar los niveles de gentamicina. Se inmovilizaron anticuerpos policlonales de cabra contra gentamicina-BSA sobre pocillos de placas de microvaloración. La gentamicina compite con la biotina-gentamicina por la unión al anticuerpo. La cantidad de biotina-gentamicina unida se midió con peroxidasa de rábano picante-estreptavidina, cuya actividad enzimática se detectó con tetrametilbencidina (TMB). Las muestras se diluyeron con el diluyente de ensayo ELISA de acuerdo con la dilución aceptable establecida durante la cualificación de la muestra. Se cuantificó la gentamicina mediante lectura de absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microvaloración. Se usó un programa informático de ajuste de curvas con un mínimo de 4 parámetros para generar la curva patrón y calcular automáticamente la concentración de la muestra. Normalmente, el intervalo de notificación para la curva estándar en el ensayo de gentamicina es de 0,58 ng/ml a 90 ng/ml. Para cada muestra se analizaron 2-4 diluciones y se promediaron los valores. Los valores de gentamicina se dividieron por la concentración de proteína y los resultados se notificaron en unidades de ppm (ng de gentamicina/mg de proteína).

Cuantificación de polietilenimina

Todos los datos se registraron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz equipado con una criosonda TCI con gradiente de 5 mm y un muestreador automático. Los datos se adquirieron usando una secuencia de pulsos de eco de espín diseñada para minimizar las señales de resonancia de la proteína en solución. Se diseñó una secuencia de pulsos de excitación acoplada con una secuencia de pulsos de presaturación para minimizar la señal de resonancia del agua en solución. Antes de la medición por RMN, se añadió D₂O a todas las muestras hasta una concentración final de un 10 % (630 ml de muestra + 70 ml de D₂O).

El ensayo cuantitativo de RMN es un procedimiento analítico general y se puede aplicar a un número excepcionalmente grande de moléculas orgánicas. En general, cada molécula tiene un conjunto único de señales de RMN con frecuencias de resonancia, intensidades relativas de picos, anchuras de línea y patrones de acoplamiento característicos. El único criterio para que el ensayo de RMN sea adecuado para determinar la concentración de una molécula pequeña que contiene protones es que la señal de RMN del analito y la de los componentes del tampón no se solapen. El análisis por RMN es exacto y preciso en un amplio intervalo de concentraciones de analito (por ejemplo, de 1 µg/ml a 154 500 µg/ml para propilenglicol).

Membranas cromatográficas

Las membranas probadas fueron Mustang™ S (Pall Corporation, East Hills, Nueva York) y Natrix S (Natrix Separations, Burlington, Canadá). Las membranas Mustang™ S y Natrix S son membranas de fuerte intercambio catiónico que se unen eficazmente a las proteínas cargadas positivamente y a las partículas víricas. La membrana Mustang™ S está hecha de polietersulfona (PES) con poros de 0,8 µm y modificada con una forma de ácido sulfónico. La membrana Natrix S consiste en un hidrogel polimérico formado dentro de una matriz de soporte porosa flexible. La matriz de soporte proporciona resistencia mecánica, mientras que las propiedades de hidrogel determinan la química de separación del producto. Para aumentar la capacidad de unión, el fabricante puede combinar múltiples capas de membrana en cada dispositivo. El número total de capas y el grosor varían según el fabricante y el tamaño del dispositivo que se fabrica. El volumen de membrana (VM) es el volumen físico de la membrana (sólidos y vacíos) y se mide en unidades de ml. En este estudio se utilizó una variedad de dispositivo de membrana que representa escalas múltiples. La tabla 2 enumera las especificaciones pertinentes para cada membrana probada.

Tabla 2: Características de las membranas de fuerte intercambio catiónico.

Membrana	Fabricante	Dispositivo	Ref.	N.º de capas	Volumen de	Tamaño
					membrana (VM)	de poro
					ml	µm
Mustang™ S	Pall Corporation	Acrodisc® de 25 mm	MSTG25S6	6	0,18	0,8
Mustang™ Q		Disco	MSTG18Q16	16	0,35	0,8
Natrix S	Natrix Separations, Inc.	Columna de jeringa de 25 mm	NX1001	1	0,23	N/A
		Columna de jeringa de 50 mm	NX1101	1	0,75	N/A

5 Resinas cromatográficas

Las resinas ensayadas fueron Fractogel SE Hicap (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, Nueva Jersey) y SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, New Jersey). Las resinas Fractogel SE Hicap y SP Sepharose Fast Flow son resinas de fuerte intercambio catiónico. La resina Fractogel SE Hicap está hecha de partículas de polimetacrilato reticulado de 40-90 µm de diámetro con un tamaño de poro de aproximadamente 800 Å. El ligando funcional se une covalentemente a la partícula con una cadena polimérica lineal larga. La resina SP Sepharose Fast Flow está hecha de partículas de agarosa altamente reticuladas de 45-165 µm de diámetro con un límite de exclusión de ~ 4.000.000 Da. Sepharose Fast Flow es un derivado reticulado de Sepharose con un ligando de sulfopropilo como grupo funcional. El procedimiento de reticulación es una patente del fabricante.

15

Sistemas de purificación con membrana y resina

Se realizaron pruebas a pequeña escala con un AKTA Explorer™ 100 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut), que es un sistema de purificación de procedimiento programable que incluye una bomba dosificadora integrada, un sensor de presión y un sensor pH, conductividad y UV en línea. El sistema Explorer se programó y controló a través de un ordenador que ejecutaba el software UNICORN™ v5.10 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut). También se realizaron pruebas a pequeña escala utilizando un sistema manual que constaba de una bomba peristáltica de control digital Masterflex® L/S® (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois), un sensor de presión en línea DTX™ Plus TNF-R (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y una balanza AND EK-1200i (A&D Company Ltd., Tokio, Japón). La balanza se usó para monitorizar físicamente el caudal de la bomba midiendo la acumulación de masa. La masa se convirtió en volumen asumiendo una densidad del flujo de alimentación de 1,0 g/ml. La presión de los transductores en línea y la masa de la balanza se monitorizaron continuamente utilizando un sistema de adquisición de datos en red NetDAQ™ 2640A/41A (Fluke, Everett, Washington) que estaba conectado a un ordenador que ejecutaba el software TrendLink™ versión 3.1.1 (Canary Labs Inc., Martinsburg, Pennsylvania) y RsCom versión 2.40 (A&D Company Ltd., Tokio, Japón) para datos de presión y masa, respectivamente.

30

Técnicas de recogida de muestras de flujo continuo en membranas

Se recogieron muestras de flujo continuo de tres maneras diferentes. La recogida de muestras aleatorias y fracciones fue la más común. Una muestra aleatoria es una pequeña alícuota instantánea de caudal tomada a un tiempo de procesamiento específico. Las fracciones son muestras de flujo continuo mayores y se definen mediante intervalos de procesamiento. El flujo continuo también se recogió como una única mezcla de gran volumen. El análisis de la mezcla es eficaz, pero la toma de muestras aleatorias y fracciones es en general más útil para monitorizar los niveles de mAb e impurezas, ya que las muestras consecutivas se pueden combinar para mostrar las tendencias.

40

Técnicas de capacidad de unión dinámica (DBC)

Las capacidades de unión dinámica (DBC) de las membranas y resinas se determinaron cargando el flujo de alimentación en el medio a un caudal de procesamiento típico. Esto fue preferente, en lugar de dejar que los medios se empaparan en el flujo de alimentación de carga, como normalmente se hace para determinar una capacidad de unión estática. Para esta aplicación, la DBC era una medida más adecuada del rendimiento de los medios. La DBC se determinó tomando muestras aleatorias o fracciones de flujo continuo durante la fase de carga. El uso del procesamiento específico para muestras aleatorias o el volumen de todas las fracciones y la concentración del polipéptido o de las impurezas para todas las muestras aleatorias o fracciones permitió generar un gráfico de DBC. Además, si las concentraciones de polipéptido o de impurezas en el material de carga eran conocidas, se podía generar un gráfico para comparar las concentraciones de filtrado (C) con la concentración de

50

carga (C_0). En este caso, un valor de C/C_0 de 0 indica que la concentración de filtrado es mucho menor que la concentración de carga, mientras que un valor de C/C_0 de 1 indica que la concentración de filtrado es similar a la concentración de carga.

5 Procedimiento experimental

Las materias primas se sacaron del almacenamiento en frío (2-8 °C o ≤ -70 °C) y se dejó que alcanzaran temperatura ambiente. A continuación, se ajustó opcionalmente el pH y/o la conductividad a partir de las condiciones mostradas en la tabla 1 usando un agente de valoración apropiado (es decir, base Tris 1,5 M o ácido cítrico 1 M) o diluyente (agua purificada o cloruro de sodio 5 M). A continuación, se realizó un filtrado fuera de línea usando un filtro de vacío AcroPak™ 20 (Pall Corporation, East Hills, Nueva York), AcroPak™ 1000 (Pall Corporation, East Hills, Nueva York) o de 1000 ml (Thermo Fisher Scientific, Rochester, Nueva York) para eliminar cualquier precipitado que pudiera haberse formado durante el almacenamiento en frío o acondicionamiento.

El sistema de purificación se preparó lavando la carga y las líneas de flujo continuo con agua purificada o un tampón apropiado. La membrana se colocó en línea después de la bomba de alimentación y el sensor de presión y luego se lavó con 50-500 VM de agua purificada o tampón de equilibrado. Después del lavado, el flujo de alimentación se cargó en la membrana y se cargó una cantidad variable a un caudal constante de 333-2667 VM/hora. Durante la fase de carga, se muestreó el flujo continuo según fue necesario. La membrana se lavó opcionalmente con tampón para arrastrar cualquier producto residual. Para mantener la retención de impurezas en la membrana, el tampón de arrastre (también conocido como tampón de lavado) presentaba en general un pH similar y una conductividad igual o inferior a la alimentación.

A continuación, se analizaron las muestras aleatorias, fracciones o mezclas resultantes de la membrana para determinar las concentraciones de polipéptido y/o impurezas.

En algunos casos, las mezclas resultantes de la membrana se cargaron luego en una resina. La cromatografía en resina solo se realizó con un sistema Äkta Explorer, por lo que los valores de absorbancia UV, pH y conductividad podrían variar en tiempo real y el mezclado podría verse facilitado por el sensor UV en línea. Durante la fase de carga, se muestreó el flujo continuo según fue necesario.

En algunos casos, la membrana se eluyó. La elución de la membrana solo se realizó usando el sistema Äkta Explorer, por lo que el mezclado podría verse facilitado por el sensor UV en línea. La membrana se eluyó usando un tampón con alto contenido de sal (acetato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 350 mM, pH 5,5). Además, en algunos casos, la membrana se eluyó con un gradiente de dos tampones (acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0 mM, pH 5,5 y acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2000 mM, pH 5,5) de 0-100 % en 20 ml.

En algunos casos, la resina se eluyó. La elución de la resina solo se realizó usando el sistema Äkta Explorer, por lo que el mezclado podría verse facilitado por el sensor UV en línea. Las resinas se eluyeron usando un gradiente de tampón con alto contenido de sal (acetato de sodio 50 a 500 mM, pH 5,5) o una etapa con alto contenido de sal (HEPES 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, Triton al 0,05 %, DTT 1 mM, pH 7,5) a un caudal constante de 200 cm/h y se combinaron de 0,5-1,0 OD o 1,25-1,25 OD para las resinas Fractogel SE Hicap y SP Sepharose Fast Flow, respectivamente.

45 Resultados

Rendimiento de la membrana de intercambio catiónico a pequeña escala

La mezcla de intercambio aniónico mAb 1 a pH 8,0 y 5,0 mS/cm y la mezcla de intercambio aniónico mAb 1 que se ajustó a pH 5,5 y 6,4 mS/cm usando ácido cítrico 1 M se procesaron sobre una membrana Mustang™ S a 667 VM/hora. La membrana Mustang™ S utilizada fue un dispositivo Acrodisc® de 0,18 ml. Los flujos de alimentación de la mezcla mAb 1 a pH 5,5 y pH 8,0 estaban ambas por debajo del pI del anticuerpo y, por lo tanto, estaban cargadas positivamente. Se analizaron las concentraciones de anticuerpo en el flujo de alimentación y en muestras aleatorias de flujo continuo. Aunque las muestras iniciales muestran cierta unión del anticuerpo a la membrana, la figura 3 muestra que el rendimiento es similar en ambas condiciones de pH, aumentando rápidamente hasta una densidad de carga de 1000 g/l y pudiendo alcanzar un valor de ≥ 96 % a partir de una densidad de carga de aproximadamente 5000 g/l.

Rendimiento de las membranas de intercambio aniónico a pequeña escala

Con fines comparativos, se seleccionó la mezcla mAb 2 para realizar pruebas usando una membrana de intercambio aniónico por encima del punto isoeléctrico de 7,7. Las proteínas son propensas a la desamidación y a la agregación a pH alto, por lo que no se realizaron pruebas similares en mAb 1. La mezcla de intercambio catiónico a pH 5,5 y 9 mS/cm se ajustó a pH 8,0 utilizando una base Tris 1,5 M. La materia prima se dividió en tres mezclas separadas y la conductividad se ajustó usando agua purificada. La primera mezcla estaba a 10 mS/cm, la segunda y la tercera mezcla se ajustaron a 7 mS/cm y 4 mS/cm, respectivamente. Las tres mezclas se mantuvieron a pH

8,0. A continuación, cada flujo de alimentación se procesó en una membrana Mustang™ Q de 0,35 ml de pequeña escala a un caudal constante de 600 VM/hora. La mezcla mAb 3 a pH 8,0 estaba 0,3 unidades de pH por encima del pI y, por lo tanto, el anticuerpo estaba cargado negativamente. Las mezclas de carga y flujo continuo se analizaron para determinar la concentración de anticuerpo. La figura 4 muestra que el rendimiento es similar en las tres condiciones de pH, aumentando rápida e inicialmente hasta una densidad de carga de 200 g/l y pudiendo alcanzar un valor de ≥ 96 % a partir de una densidad de carga de aproximadamente 1000 g/l.

Eliminación de impurezas con membranas de intercambio catiónico a pequeña escala

Para evaluar la eliminación de impurezas con membranas de intercambio catiónico, la mezcla de proteína A mAb 3 a pH 5,5 y 3,2 mS/cm se procesó en una membrana Mustang™ S de 0,18 ml de pequeña escala a un caudal constante de 1333 VM/hora. La carga de mAb 3 era 3,4 unidades por debajo del pI calculado y, por lo tanto, el anticuerpo estaba cargado positivamente. La carga, las fracciones de flujo continuo y las muestras de elución se analizaron y los resultados para CHOP se muestran en la figura 5. Los datos muestran que la membrana Mustang™ S redujo inicialmente la cantidad de CHOP de 438 a 109 ppm. La cantidad de CHOP aumentó hasta 318 ppm a medida que la densidad de carga se acercaba a 55 300 g/l. La membrana se eluyó usando una solución que contenía un alto contenido de sal. Los iones de la sal se usan para apantallar las cargas, alterando de este modo las interacciones electrostáticas y haciendo que las proteínas desorben de la superficie de la membrana y se muevan libremente en la fase móvil. El análisis de la mezcla de elución muestra un enriquecimiento de impurezas que confirma que la CHOP se une a la membrana debido a fuerzas electrostáticas.

Para evaluar adicionalmente el rendimiento del adsorbente, la mezcla de intercambio aniónico mAb 3 a pH 5,5 y 6,0 mS/cm se procesó en una membrana Mustang™ S de 0,18 ml de pequeña escala a un caudal constante de 667 VM/hora. El pH de mAb 3 era 3,4 unidades de pH por debajo del pI y, por lo tanto, el anticuerpo estaba cargado positivamente. Se analizaron las concentraciones de mAb, CHOP y gentamicina en el flujo de alimentación y en muestras aleatorias de flujo continuo. Para comparar las concentraciones en el flujo de alimentación y en muestras aleatorias, se generó un gráfico C/C_0 (muestra aleatoria / carga) como una función de la densidad de carga de la membrana. Como se muestra en la figura 6, los valores de C/C_0 del mAb son cercanos a 1,0 a densidades de carga de 2 a 16 kg/l, lo que sugiere que las concentraciones en de las muestras aleatorias son casi idénticas a la concentración de carga y, una vez más, el rendimiento sería alto. Por el contrario, los valores de C/C_0 de CHOP y gentamicina son bajos, $\leq 0,2$, a densidades de carga de 2 a 16 kg/l, lo que sugiere que las concentraciones de las muestras aleatorias son mucho menores que la concentración de carga y que la membrana Mustang™ S está eliminando la mayoría de estas impurezas a pesar de estar sobrecargada con mAb.

Selectividad de unión a membranas de intercambio catiónico a pequeña escala

Para evaluar si las membranas de intercambio catiónico son selectivas para la unión a ciertas impurezas frente a mAb, se diseñaron y ejecutaron una serie de experimentos usando la mezcla de proteína A mAb 3. Esta mezcla se eligió debido a su mayor nivel de impurezas, que incluyen especies de alto peso molecular (HMWS), dímero, especies de bajo peso molecular (LMWS), gentamicina y CHOP. La mezcla de proteína A se ajustó a pH 5,5 y 4,4 mS/cm. Antes de la carga, cada membrana Mustang™ S se equilibró con tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 5,5 y 1,3 mS/cm. Se realizaron cuatro experimentos, cada uno cargando una membrana Mustang™ S de 0,18 ml a 1333 VM/hora a densidades de carga de 1000, 5000, 10 000 o 15 000 g/l. Después de la carga, las membranas se lavaron con tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 5,5 y 1,3 mS/cm. Después del lavado, se usó una elución en gradiente usando tampón de lavado y acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2 M, pH 5,1 y ~ 500 mS/cm para eluir la membrana. El gradiente se formó en 20 ml, y se tomaron fracciones de elución cada 2 ml para su análisis. En los cuatro experimentos, las fracciones de elución se analizaron para todas las concentraciones de impurezas y de mAb. En cualquier experimento de densidad de carga dado, las fracciones podrían compararse para determinar cuándo se eluye una impureza o un mAb de la membrana, estando ligadas más estrechamente las especies que eluyen más tarde que las especies que eluyen antes. La figura 7 muestra las concentraciones normalizadas en % de las diversas especies analizadas a través de la elución de 10 fracciones para el experimento con una densidad de carga de 5000 g/l. La posición de cada pico sugiere que el monómero de mAb es el que se une más débilmente a la membrana, ya que eluye el primero. En un orden creciente de fuerza de unión, el monómero va seguido por HMWS, dímero, CHOP, LMWS y gentamicina. Aunque muchas especies eluyen en una posición similar en el gradiente, este gráfico muestra claramente que la gentamicina se une mucho más fuertemente que las especies competidoras.

Además, para cada densidad de carga, la masa total de cada impureza o mAb unido a la columna podría calcularse y compararse entre los diversos experimentos de densidad de carga. La figura 8 muestra la masa normalizada en % de cada especie como una función del aumento de la densidad de carga en la membrana. La dirección de las líneas indica si la masa de la especie está aumentando o disminuyendo. El monómero de mAb, que previamente se había demostrado que era el que más débilmente se unía, tiene niveles decrecientes de masa a medida que aumenta la densidad de carga. Por el contrario, la masa de dímero, HMWS, CHOP, gentamicina y LMWS aumenta a medida que aumenta la densidad de carga. Esto confirma los resultados de la fuerza de unión previos y sugiere que la masa de monómero de mAb está disminuyendo debido a que las otras especies se unen continuamente a la membrana.

Desplazamiento de las membranas de intercambio catiónico a pequeña escala

Para determinar si una especie de unión fuerte tal como la gentamicina puede eluir el monómero de mAb, como hipótesis para explicar los resultados de selectividad de unión, se realizó un experimento usando la mezcla de proteína A mAb 3. La mezcla de proteína A se ajustó a pH 5,5 y 4,2 mS/cm. El experimento se realizó equilibrando la membrana Mustang™ S de 0,18 ml con acetato de sodio 20 mM, pH 5,4. La mezcla de proteína A mAb 1 se cargó hasta que la tendencia de absorbancia UV mostró claramente una ruptura del mAb. La membrana se lavó entonces con tampón de equilibrado antes de que se usara un tampón de elución compuesto de tampón de equilibrado y 2 g/l de gentamicina para eluir la membrana. Debe observarse que el tampón de equilibrado y el tampón de elución tenían pH y conductividad idénticos para evitar cualquier efecto sobre la unión del mAb a la membrana. La figura 9 muestra el cromatograma, incluidas las tendencias de absorbancia UV, pH y conductividad, durante las fases de carga, lavado y elución. El cromatograma muestra que la fase de lavado fue suficiente para devolver la tendencia de absorbancia UV a niveles iniciales antes de que se iniciara la fase de elución. También muestra que, durante la fase de elución, se observa un gran pico de absorbancia UV sin ningún cambio significativo en las tendencias de pH o conductividad. Esto demuestra que la gentamicina puede desplazar eficazmente el monómero de mAb unido de una membrana de intercambio catiónico.

Comparación de la unión de gentamicina a membranas CEX

Para determinar la capacidad de unión de la gentamicina a membranas CEX, se realizaron experimentos con la membrana Mustang™ S de 0,18 ml y la membrana Natrix S de 0,23 ml. Se ajustó un tampón PBS a pH 7,2 con ácido acético 2,0 M y AP hasta un pH final de 5,00 y una conductividad de 8,10 mS/cm. El tampón ajustado se enriqueció entonces la mezcla UF/DF mAb 3 y gentamicina hasta concentraciones finales de aproximadamente 1,0 mg/ml y 40.000 ng/ml, respectivamente. La solución enriquecida resultante se usó como el flujo de alimentación de carga.

Para realizar los experimentos, ambas membranas se lavaron con AP, se equilibraron con el tampón ajustado, se cargaron con la solución enriquecida y se lavaron con el tampón ajustado. Durante la fase de carga, se recogieron muestras aleatorias de flujo continuo de 4 ml para la membrana Mustang™ S a 20, 40, 60 y 80 ml. Para la membrana Natrix S, se recogió una muestra aleatoria de flujo continuo de 4 ml a 10 ml y luego cada 60 ml hasta un total de 19 muestras. En todas las muestras se analizó después la concentración de mAb y gentamicina y se compararon con las concentraciones de carga para crear un gráfico C/C_0 frente a la densidad de carga de la membrana, como se muestra en la figura 10.

Aunque no se representa gráficamente, la concentración de mAb alcanza un valor de C/C_0 de 1,0, lo que sugiere que la etapa sería de alto rendimiento para el anticuerpo en el flujo continuo. Los valores de C/C_0 para gentamicina, por el contrario, alcanzan 1,0 mucho más tarde, lo que sugiere que ambas membranas se unen a niveles significativos de gentamicina. La membrana Mustang™ S tenía una capacidad de unión a gentamicina entre 4,4 y 8,9 g/l_m, mientras que la Natrix S tenía una mayor capacidad de unión a gentamicina y mostró un avance más lento. A 50 g/l, el valor de C/C_0 era 0,3 y la curva de ruptura era bastante lineal hasta aproximadamente 125 g/l_m y un valor de C/C_0 de aproximadamente 0,8. A partir de 125 g/l_m, la curva de ruptura se aplana, lo que sugiere que la membrana aún puede unirse a gentamicina mientras que posiblemente desplaza pequeños niveles de mAb.

Estos resultados muestran que diferentes membranas CEX tienen diferentes capacidades de unión a gentamicina y curvas de ruptura. La membrana Natrix S, con su mayor capacidad de unión y ruptura gradual, sería una membrana más eficaz para eliminar la gentamicina. Además, al unirse a niveles más altos de gentamicina, cabría esperar que se desplace más mAb, dando como resultado una operación de mayor rendimiento.

Resinas CEX y los efectos de los antibióticos aminoglucósidos fuertemente enlazantes

Para determinar qué efecto puede tener una impureza fuertemente enlazante tal como la gentamicina en una columna empaquetada de resina CEX, se diseñaron una serie de experimentos para evaluar flujos de alimentación modelo y reales, con o sin una membrana CEX que proteja la columna.

La figura 11 muestra los diversos experimentos, concentraciones de anticuerpos e impurezas, y las etapas necesarias para realizar estos experimentos.

En primer lugar, usando un flujo de alimentación modelo de PBS enriquecida con la mezcla UF/DF mAb 3 y niveles variables de gentamicina, se evaluó la capacidad de unión a anticuerpo de una resina Fractogel SE Hicap mediante la generación de curvas de ruptura. La PBS se ajustó primero con ácido acético 1,0 M a pH 5,0, luego se ajustó con AP a una conductividad de 8,0 mS/cm. La mezcla UF/DF se añadió al tampón ajustado a una concentración de mAb de aproximadamente 1,6 mg/ml.

Para cada experimento de cromatografía realizado, la resina Fractogel SE Hicap se equilibró primero con acetato de sodio 25 mM a pH 5 antes de cargar el flujo de alimentación deseado. Tras la carga, la columna se lavó con

acetato de sodio 50 mM a pH 5,5, se lavó con HEPES 25 mM a pH 7,7, se lavó con acetato de sodio 50 mM a pH 5,5, se eluyó usando acetato de sodio 350 mM a pH 5,5, se regeneró con NaCl 1 M y NaOH 0,5 N, y luego se almacenó en NaOH 0,1 N hasta el próximo uso de la columna.

5 Sin agregar gentamicina, se realizó un primer experimento y mostró una DBC de anticuerpo de 108 g/l. A continuación, se realizó el ajuste y adición anterior con la adición de gentamicina hasta una concentración final de 24 100 mg/ml. Este experimento mostró una disminución de la DBC de anticuerpo de 89 g/l. Esa condición se repitió con una concentración de gentamicina de 30 500, y se calculó la DBC de anticuerpo de 88 g/l. Estos datos muestran que, al usar un sistema modelo de PBS, anticuerpo purificado y niveles variables de gentamicina, la presencia de gentamicina disminuye la DBC del anticuerpo en la resina Fractogel SE Hicap de 108 mg/ml a aproximadamente 88 g/l.

15 A continuación se realizaron dos experimentos utilizando fluido de cultivo celular recogido (HCCF) que contenía aproximadamente 0,9 mg/ml de mAb 3, 24 100-30.000 ng/ml de gentamicina y 408.000 ng/ml de CHOP. Utilizando HCCF a niveles de gentamicina consistentes con el flujo de alimentación modelo, las DBC del anticuerpo son 68 y 71 g/l. Una posible explicación de la diferencia entre las DBC de flujo de alimentación modelo de 88 y 89 g/l y las DBC de 68 y 71 g/l usando HCCF es la presencia de niveles altos de CHOP en el flujo de alimentación.

20 La figura 12 muestra todas las curvas de ruptura de anticuerpo de los experimentos mencionados anteriormente, así como los niveles de impurezas del flujo de alimentación y las DBC aproximadas. Las ejecuciones también se realizaron en un orden aleatorio para evitar la posible degradación de la columna o el arrastre de gentamicina de una ejecución a otra. El orden de los experimentos se enumera en la tabla que acompaña a la figura 12. No hubo correlación entre el orden de los experimentos y las DBC de anticuerpo, por lo que es poco probable que la columna se estuviera degradando o que el arrastre de gentamicina estuviera afectando a las ejecuciones posteriores.

Finalmente, sabiendo que la presencia de gentamicina en el flujo de alimentación muestra una disminución significativa de las DBC de la columna y que las membranas CEX son capaces de unirse a la gentamicina sin unirse a niveles significativos de anticuerpo, se realizaron dos experimentos para evaluar si una membrana CEX podría proteger y mejorar el rendimiento de una resina CEX. Debido a que Natrix S mostró una capacidad de unión mejorada de gentamicina con respecto a Mustang™ S, se usó para proteger la resina Fractogel SE Hicap. Se descongelaron 2 l de HCCF, se ajustaron a pH 5 con ácido acético 2 M, se ajustaron a 8 mS/cm con AP y se filtraron de forma estéril fuera de línea para eliminar cualquier efecto de la congelación y descongelación del flujo de alimentación. A partir de este flujo de alimentación ajustado y filtrado, la carga se dividió, cargando una porción en la columna, mientras que la otra porción se procesó a través de una membrana Natrix S de 0,75 ml y luego se cargó en la resina Fractogel SE Hicap. Para ambas fases de carga de columna, se tomaron fracciones de 5 ml en aproximadamente 60 muestras cada una. Las fracciones de HCCF ajustado, de flujo continuo en Natrix y de resina Fractogel SE Hicap se analizaron para determinar las concentraciones de anticuerpo y gentamicina. En la figura 13 se muestran las concentraciones resultantes de anticuerpo e impurezas del flujo de alimentación de HCCF y de flujo continuo en Natrix, así como las curvas de ruptura de Fractogel SE Hicap resultantes. Los datos resultantes muestran que la Natrix redujo con éxito los niveles de gentamicina en el HCCF ajustado de 24 100 ng/ml a 870 ng/ml. Los niveles de CHOP disminuyeron ligeramente de 408.000 ng/ml a 328.000 ng/ml. La concentración de anticuerpo fue ligeramente inferior a 0,83 mg/ml en comparación con la concentración ajustada de HCCF de 0,88 mg/ml, lo que representa un rendimiento de aproximadamente un 94 %. Finalmente, las curvas de ruptura de la columna CEX resultantes muestran que la columna tenía una DBC de anticuerpo de 72 g/l usando el HCCF ajustado y una DBC de anticuerpo de 94 g/l usando el flujo continuo en Natrix. Esto representa un aumento aproximado de un 30 % en la DBC al pasar un flujo de alimentación que contiene gentamicina a través de una membrana CEX antes de cargarlo en la columna CEX.

50 Ruptura de ECP y PEI en membranas CEX

Para evaluar si se podía observar un rendimiento similar usando una membrana CEX con otras impurezas, tales como ECP o PEI, se realizó un experimento usando la mezcla de proteína A Anticuerpo monovalente 1 y una membrana Natrix S de 0,23 ml. La mezcla de proteína A usada se había ajustado previamente a pH 6,7 usando una base TRIS 1,5 M y se diluyó a una conductividad de 2,5 mS/cm usando AP. La carga, que tenía una concentración de anticuerpo de 4,7 g/l, 130 µg/ml de PEI y 8870 µg/ml de ECP, se cargó en una membrana Natrix S equilibrada y se tomaron fracciones de flujo continuo de 2 ml en 10 muestras, seguido de fracciones de 5 ml en 12 muestras. Las fracciones de flujo continuo se analizaron después para determinar la concentración de anticuerpo, PEI y ECP, que se usaron luego para generar un gráfico de C/C_0 frente a la densidad de carga de anticuerpo de la membrana. La figura 14 muestra que tanto el anticuerpo como las ECP llegaron al punto de ruptura de la membrana CEX a aproximadamente 123 mg/ml. Dado que el nivel de cuantificación de PEI es de 30 µg/ml, las primeras muestras estaban a ese nivel o por debajo de él, y la figura 14 muestra un valor de C/C_0 de 0,23, ya que se desconocía qué concentración de PEI había en esas muestras. Sin tener en cuenta los niveles de PEI a un valor 0,23, la PEI parece llegar al punto de ruptura a 330 mg/ml, significativamente más tarde que el anticuerpo y las ECP. Estos resultados sugieren que las membranas CEX también son eficaces en la eliminación de polímeros iónicos sin afectar negativamente el rendimiento de anticuerpo.

Resinas CEX y los efectos de polímeros iónicos fuertemente enlazantes

Para determinar qué efecto puede tener una impureza fuertemente enlazante tal como PEI sobre una columna empaquetada de resina CEX, se realizaron una serie de experimentos evaluando los niveles de PEI usados durante la extracción del Polipéptido 1 y su efecto sobre una columna SP Sepharose Fast Flow. Debido a que el flujo de alimentación era más impuro para este producto, no fue posible cuantificar los niveles de PEI que entran en la columna, sino que se observaron los niveles de PEI utilizados durante la extracción.

Para estos experimentos, el producto extraído se acondicionó con niveles variables de PEI en el intervalo de un 0,75 a un 1,05 %, se diluyó con AP y se centrifugó para producir 4 muestras de concentrado. Cada muestra de concentrado, a aproximadamente pH 7,0 y 8,0 mS/cm, se cargó luego en la columna SP Sepharose Fast Flow con muestras de flujo continuo recogidas y analizadas para determinar la concentración de polipéptido. Los datos resultantes se usaron para generar un gráfico C/C_0 como una función de la densidad de carga del polipéptido de la resina. La figura 15 muestra las curvas de ruptura y la DBC correspondiente de la columna para cada concentrado evaluado. Como se muestra en la tabla, a medida que aumenta el % de PEI durante el proceso de extracción, disminuye la DBC de la columna.

Además, en un segundo conjunto de experimentos que usan el Polipéptido 1, se cargaron concentrados de % de PEI variables en la columna SP Sepharose Fast Flow, lavando y eluyendo posteriormente la columna para cada experimento. Las mezclas resultantes de cada experimento se analizaron a continuación para determinar la concentración de polipéptido, las ECP y el tamaño del producto mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La figura 16 muestra que las mezclas generadas usando niveles crecientes de % de PEI durante la extracción dan como resultado una disminución del rendimiento de la etapa y niveles crecientes de impurezas, tales como las ECP, los agregados del producto o los dímeros.

Aunque los experimentos no se realizaron utilizando una membrana CEX antes de esta columna CEX, sabiendo de experimentos previos que la PEI puede unirse a Natrix S y viendo el rendimiento disminuido de la columna CEX como una función del % de PEI, podría hipotetizarse que el uso de una membrana CEX en este flujo de alimentación mejoraría no solo la capacidad de unión de la columna, sino también la mezcla resultante.

Conclusión

Se ha demostrado que las membranas de intercambio iónico son eficaces en la eliminación de impurezas a condiciones de pH y conductividad que provocan la unión de proteínas. Al usar una cromatografía de sobrecarga y promover la adsorción competitiva entre las impurezas y la proteína de interés, se demostró que los rendimientos eran ≥ 96 % a partir de densidades de carga de 1000-5000 g/l_m. Se ha demostrado que las membranas de intercambio catiónico se unen a y reducen significativamente los niveles de impurezas tales como CHOP y gentamicina en las fracciones de flujo continuo de la membrana, con valores de $C/C_0 < 0,2$ hasta densidades de carga de 16.000 g/l_m. También se demostró que las membranas de intercambio catiónico exhiben selectividad para unirse a ciertas impurezas frente a anticuerpos usando flujos de alimentación más brutos que contienen especies de alta masa molecular, dímeros, especies de baja masa molecular, gentamicina y CHOP. En estos estudios se demostró que estas impurezas se unen con fuerza variable, que las densidades de carga de membrana creciente muestran una unión continua de impurezas mientras que el anticuerpo unido a la membrana disminuye y que las especies altamente cargadas de baja masa molecular como la gentamicina se unen mucho más fuertemente que las especies competidoras. Además, se confirmó que la cromatografía competitiva de adsorción y desplazamiento se produce eluyendo el anticuerpo de una membrana de intercambio catiónico usando un tampón que contiene gentamicina. Se demostró que dos membranas de intercambio catiónico, la Mustang™ S y la Natrix S, tienen capacidades de unión dinámica para gentamicina de 4,4-8,9 g/l_m y 50 g/l_m, respectivamente. La curva de ruptura para Natrix S también demostró ser más gradual que la de Mustang™ S. La membrana Natrix S está diseñada para tener mayor capacidad de unión que las membranas tradicionales, y esta propiedad, junto con la ruptura gradual, la hace adecuada para eliminar impurezas.

Se demostró que las resinas de intercambio catiónico exhiben capacidades de unión dinámica variables en presencia de gentamicina, con disminución de la DBC a medida que aumentan las concentraciones de gentamicina en el flujo de alimentación. La DBC de una columna Fractogel SE Hicap disminuyó de 108 a 88 g/l usando un flujo de alimentación modelo que contenía de 0 a 30 500 ng/mg de gentamicina. Usando un flujo de alimentación representativo, la resina Fractogel SE Hicap mostró DBC de 68-71 g/l. La utilidad de una membrana de intercambio catiónico se verificó cuando fue capaz de disminuir las concentraciones de gentamicina en ese flujo de alimentación de 24 100 ng/mg a 870 ng/mg de gentamicina con un rendimiento de un 94 %. El flujo de alimentación de concentración disminuida de gentamicina permitió que la resina Fractogel SE Hicap tuviera una DBC de 94 g/l en comparación con una de 72 g/l cuando se comparó directamente. Al igual que la gentamicina, se demostró que las membranas de intercambio catiónico se unen a polímeros iónicos altamente cargados tales como PEI en presencia de un anticuerpo monovalente y ECP. Finalmente, se demostró que las resinas de intercambio catiónico se veían negativamente afectadas por concentraciones variables de PEI en el flujo de alimentación, lo que resultaba en una menor capacidad de unión dinámica y un aumento de las impurezas en la mezcla a medida que

5 aumentaban las concentraciones de PEI. La columna SP Sepharose Fast Flow demostró una disminución de 51 g/l a 36 g/l al aumentar previamente la PEI de un 0,75 % a un 1,05 %. En un estudio separado, el rendimiento de la etapa disminuyó de un 96 % a un 70 %, los niveles de ECP aumentaron de 155 ng/mg a 904 ng/mg, los de agregado aumentaron de un 2,5 % a un 17,3 % y los de dímero aumentaron de un 3,7 % a un 5,9 % al aumentar previamente la concentración de PEI utilizada de un 0,6 % a un 1,1 %. El uso de una membrana de intercambio catiónico antes de la columna SP Sepharose Fast Flow no se probó, pero sabiendo que la columna resulta afectada negativamente por la PEI y que una membrana es eficaz en la unión a PEI, una membrana de tamaño adecuado debería reducir el % de PEI al pasar por la columna, lo que conduce a mayores capacidades de unión y mayor rendimiento, a la vez que también disminuye las concentraciones de impurezas del pool.

10 Constantemente están surgiendo mejores tecnologías de purificación. A medida que se desarrollan resinas de intercambio iónico de mayor capacidad de unión, su uso como una alternativa a la resina de afinidad de proteína A parece probable debido a la disminución de los costes operativos. Sin embargo, cuando se someten a flujos de alimentación de niveles de impurezas crecientes, o a impurezas tales como gentamicina o PEI que no se observan
15 normalmente en aplicaciones posteriores, su efectividad real puede disminuir. El uso de una membrana de intercambio iónico antes de dicha resina de intercambio iónico puede proteger la columna al reducir las impurezas cargadas en la columna. Esto puede conducir a varias mejoras para la columna, tales como mayores capacidades de unión dinámica, mayores rendimientos de etapa o concentraciones disminuidas de impurezas en la mezcla. Al seleccionar una membrana apropiada con suficiente capacidad de unión a impurezas, volumen y permeabilidad,
20 las dos etapas se pueden realizar de forma continua, lo que reduce aún más el tiempo de operación y, en última instancia, los costes del proceso de purificación.

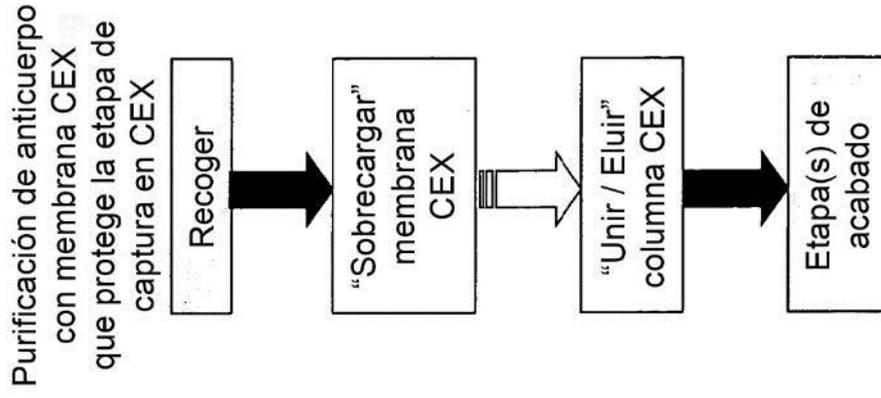
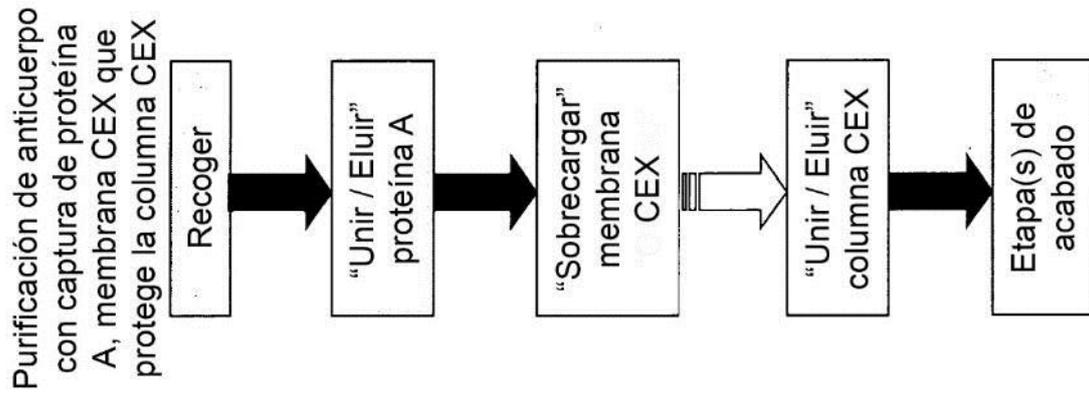
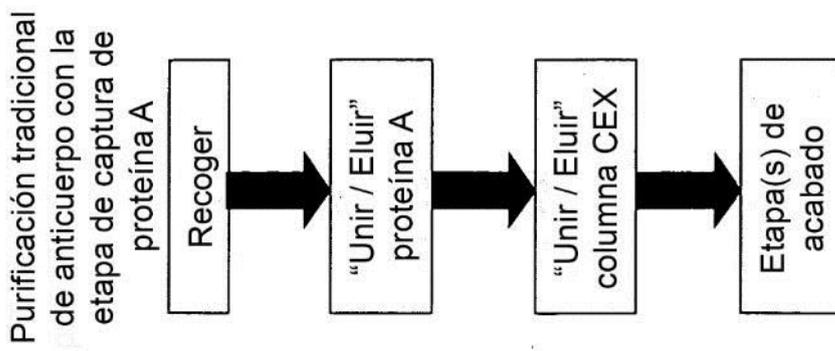
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para potenciar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende:
- 10 a. pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio iónico, en el que el anticuerpo y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH suficientemente distinto del pI del anticuerpo para potenciar la carga del anticuerpo y una baja fuerza iónica eficaz para evitar el apantallamiento de las cargas por los iones del tampón, lo que provoca que la membrana se una al anticuerpo y a al menos un contaminante;
- 15 b. sobrecargar la membrana de intercambio iónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente;
- 20 c. recoger el efluente de la membrana de intercambio iónico que comprende el anticuerpo de interés;
- d. someter el efluente de la membrana que comprende el anticuerpo de interés a una etapa de cromatografía de intercambio iónico de carga similar a la membrana anterior, y
- e. recuperar el anticuerpo purificado del efluente de la etapa de cromatografía de intercambio iónico cargada.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la membrana de intercambio iónico tiene un tamaño de poro de 0,1 a 100 µm.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la membrana de intercambio iónico se reemplaza por un monolito o filtro de profundidad.
4. Un procedimiento para potenciar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende:
- 35 a. pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio catiónico, en el que el anticuerpo y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que provoca que la membrana se una al anticuerpo y a al menos un contaminante,
- 40 b. sobrecargar la membrana de intercambio catiónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente;
- 45 c. recoger el efluente de la membrana de intercambio catiónico que comprende el anticuerpo de interés;
- d. someter el efluente de membrana que comprende el anticuerpo de interés a una etapa de purificación de cromatografía de intercambio catiónico, y
- 50 e. recuperar el anticuerpo purificado del efluente de la etapa de purificación por cromatografía de intercambio catiónico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo.
- 55 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo.
- 60 7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo.
8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el pH es de aproximadamente 1 unidad de pH por debajo del pI del anticuerpo.
- 65 9. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la conductividad es \leq aproximadamente 20 mS/cm.
10. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la conductividad es \leq aproximadamente 10 mS/cm.

11. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la membrana de intercambio catiónico es un monolito de intercambio catiónico o filtro de profundidad.
- 5 12. Un procedimiento para potenciar la eficacia de etapas de cromatografía posteriores para la purificación de anticuerpos que comprende:
- a. pasar una composición que comprende un anticuerpo de interés y diversos contaminantes a través de una membrana de intercambio aniónico, en el que el anticuerpo y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a 10 aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que provoca que la membrana se una al anticuerpo y al menos un contaminante,
- 15 b. sobrecargar la membrana de intercambio aniónico a una densidad de carga de 1000-5000 g/l de modo que al menos un contaminante permanezca unido a la membrana mientras que el anticuerpo de interés se encuentra principalmente en el efluente;
- c. recoger el efluente de la membrana de intercambio aniónico que comprende el anticuerpo de interés;
- 20 d. someter el efluente de membrana que comprende el anticuerpo de interés a una etapa de purificación de cromatografía de intercambio aniónico, y
- e. recuperar el anticuerpo purificado del efluente de la etapa de purificación por cromatografía de intercambio aniónico.
- 25 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo.
- 30 14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo.
15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH es de aproximadamente 1 unidad de pH por encima del pI del anticuerpo.
17. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la conductividad es \leq aproximadamente 20 mS/cm.
- 40 18. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la conductividad es \leq aproximadamente 10 mS/cm.
19. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la membrana de intercambio aniónico se reemplaza por un monolito de intercambio aniónico o filtro de profundidad.
- 45 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la membrana es un absorbente de modo mixto.
- 50 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el contaminante es una proteína de célula huésped.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la proteína de célula huésped es una proteína de ovario de hámster chino (CHOP).
- 55 23. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la proteína de célula huésped es una proteína de *E. coli* (ECP).
24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el contaminante es un antibiótico aminoglucósido.
- 60 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.
26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el contaminante es un polímero iónico.
- 65 27. El procedimiento de la reivindicación 26, en el que el polímero iónico es polietilenimina (PEI).

28. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 27, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
29. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que la(s) etapa(s) de purificación adicional(es) comprende(n) cromatografía de intercambio iónico.
- 5 30. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que la(s) etapa(s) de purificación adicional(es) se realiza(n) de forma continua durante las etapas a a e, siendo dicha etapa de purificación una cromatografía de intercambio iónico.
- 10 31. El procedimiento de la reivindicación 29 o 30, en el que la cromatografía de intercambio iónico comprende una columna de intercambio catiónico.
32. El procedimiento de la reivindicación 29 o 30, en el que la cromatografía de intercambio iónico comprende una columna de intercambio aniónico.
- 15 33. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, que comprende además preparar una composición farmacéutica combinando el anticuerpo purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1



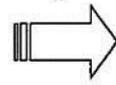
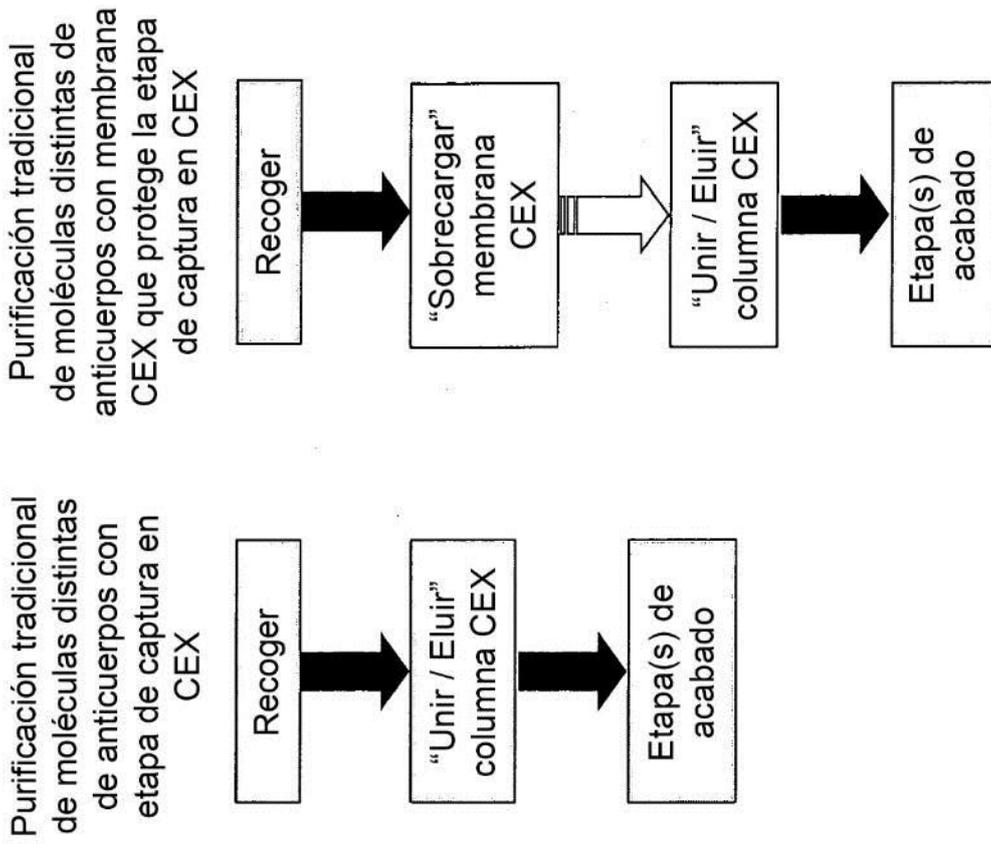
 = puede ser una operación continua

Figura 2



= puede ser una operación continua

Figura 3

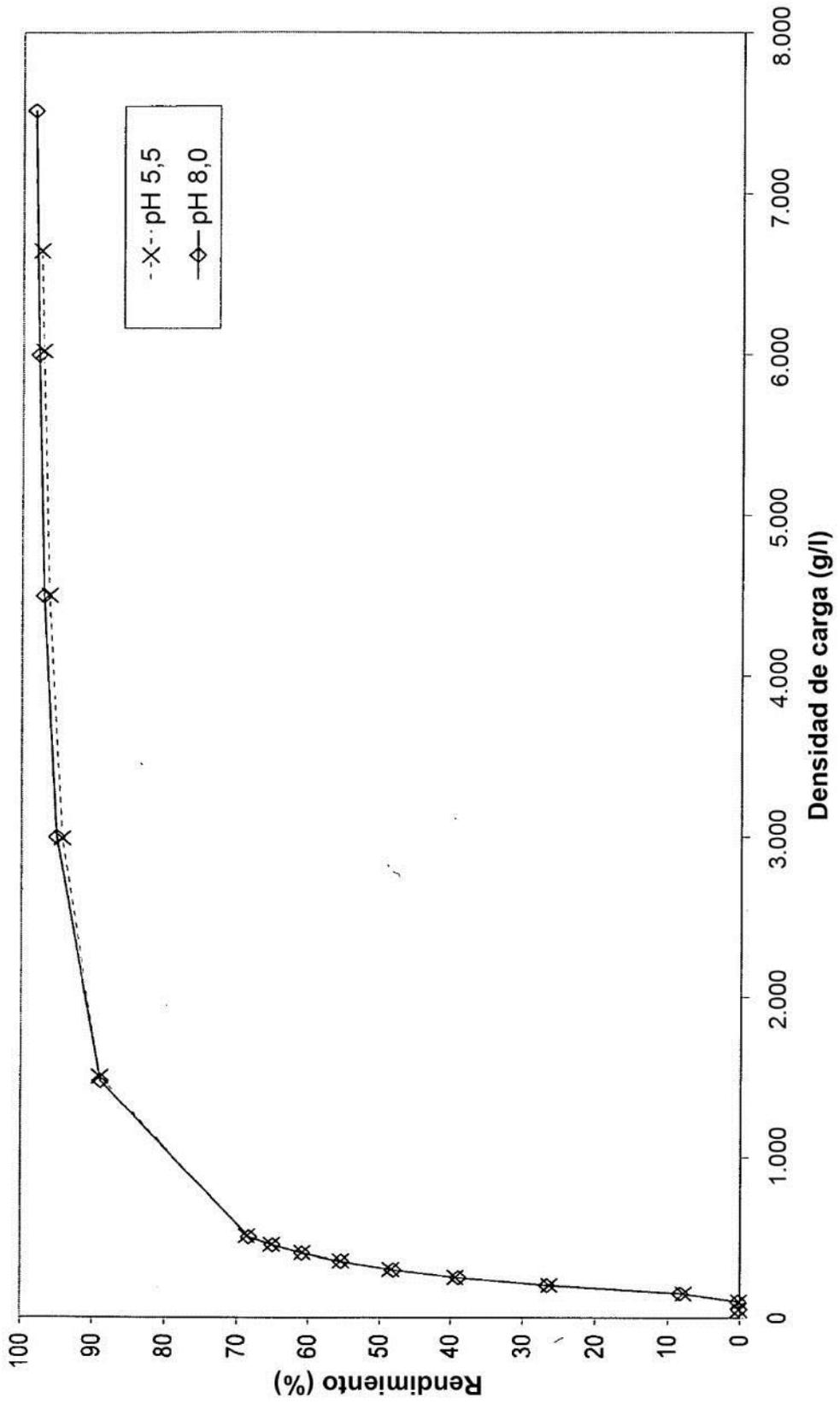


Figura 4

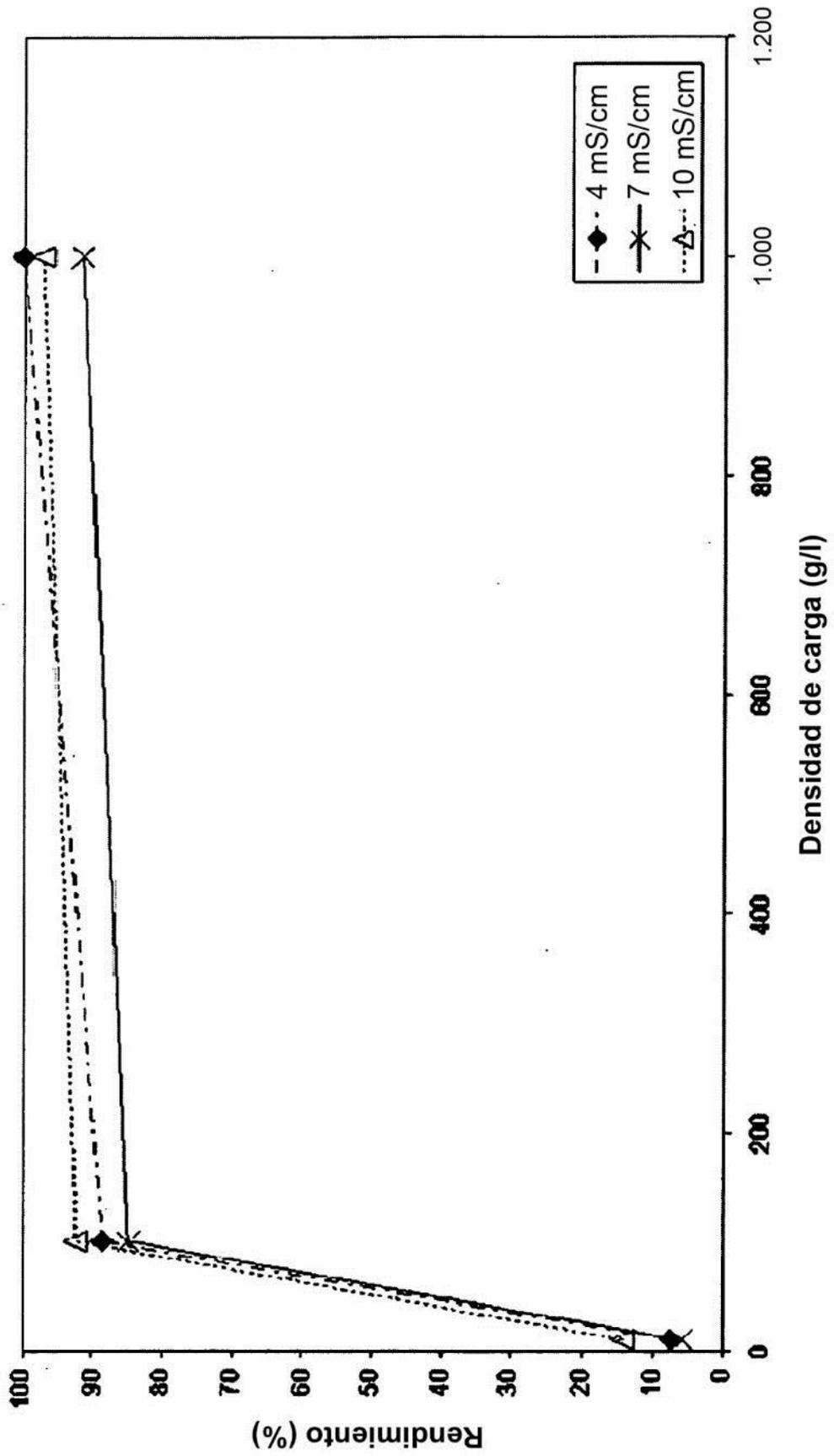
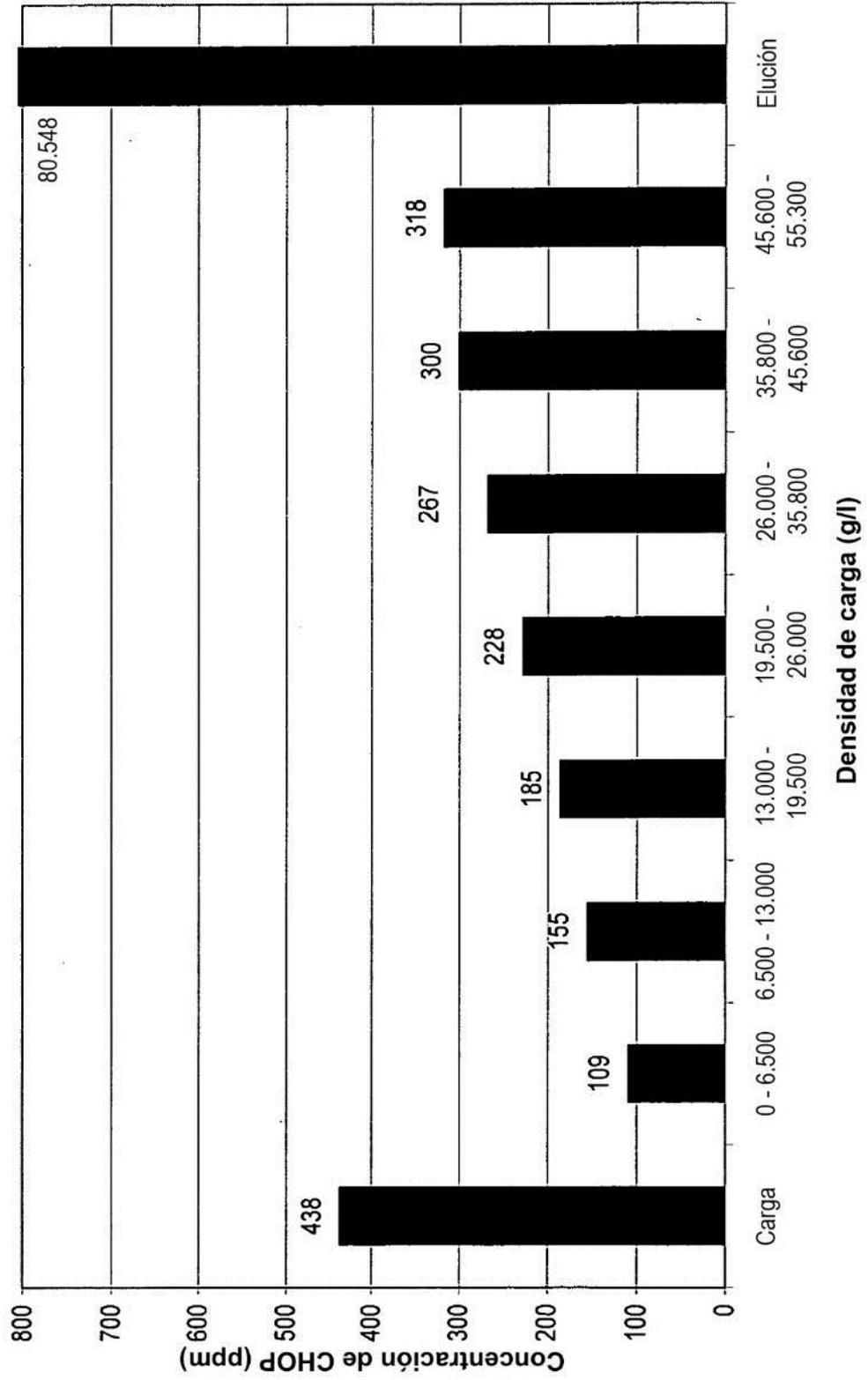


Figura 5



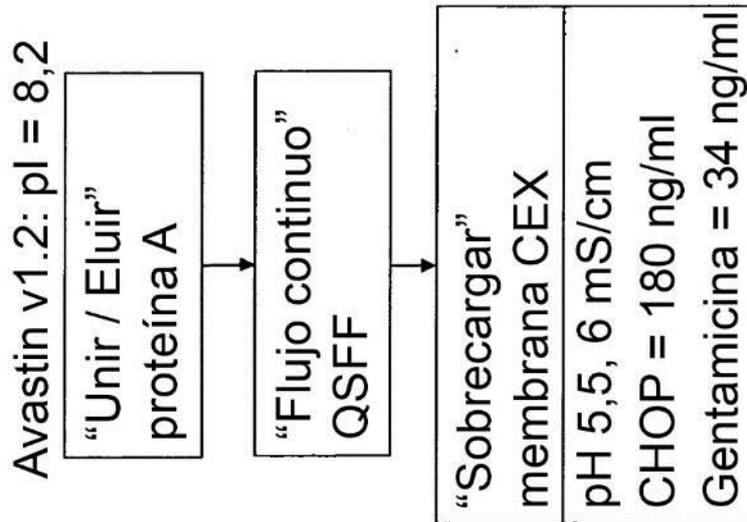


Figura 6

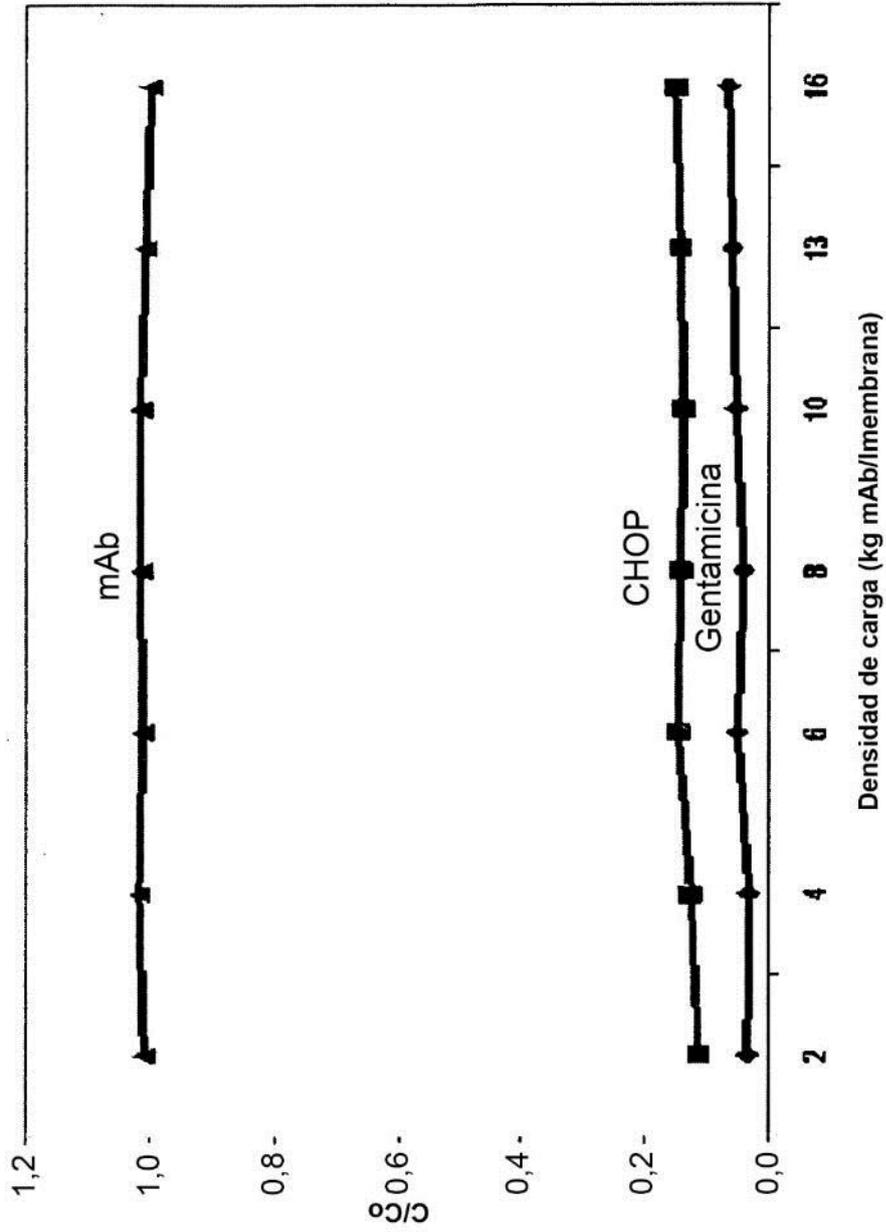


Figura 7

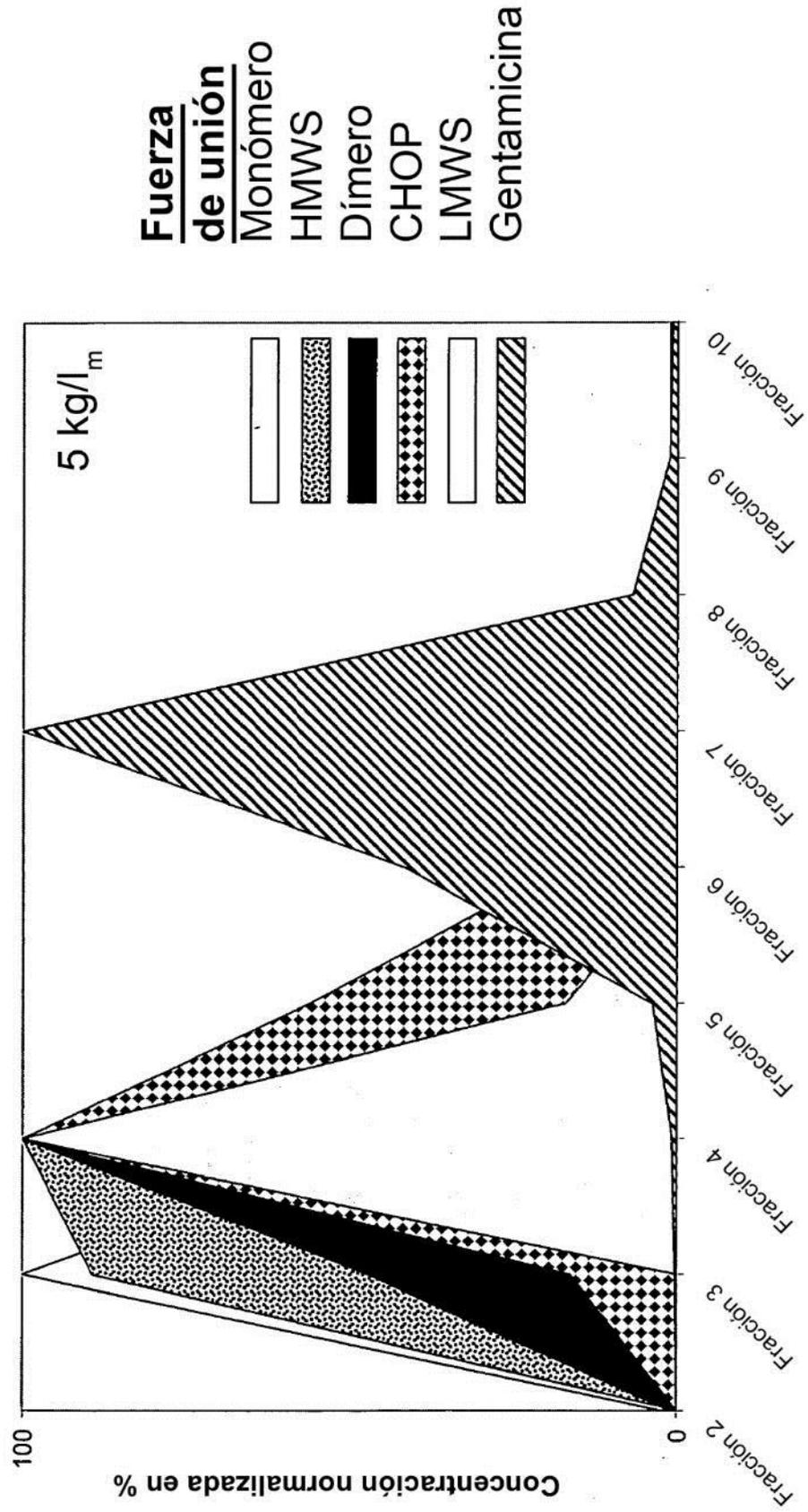


Figura 8

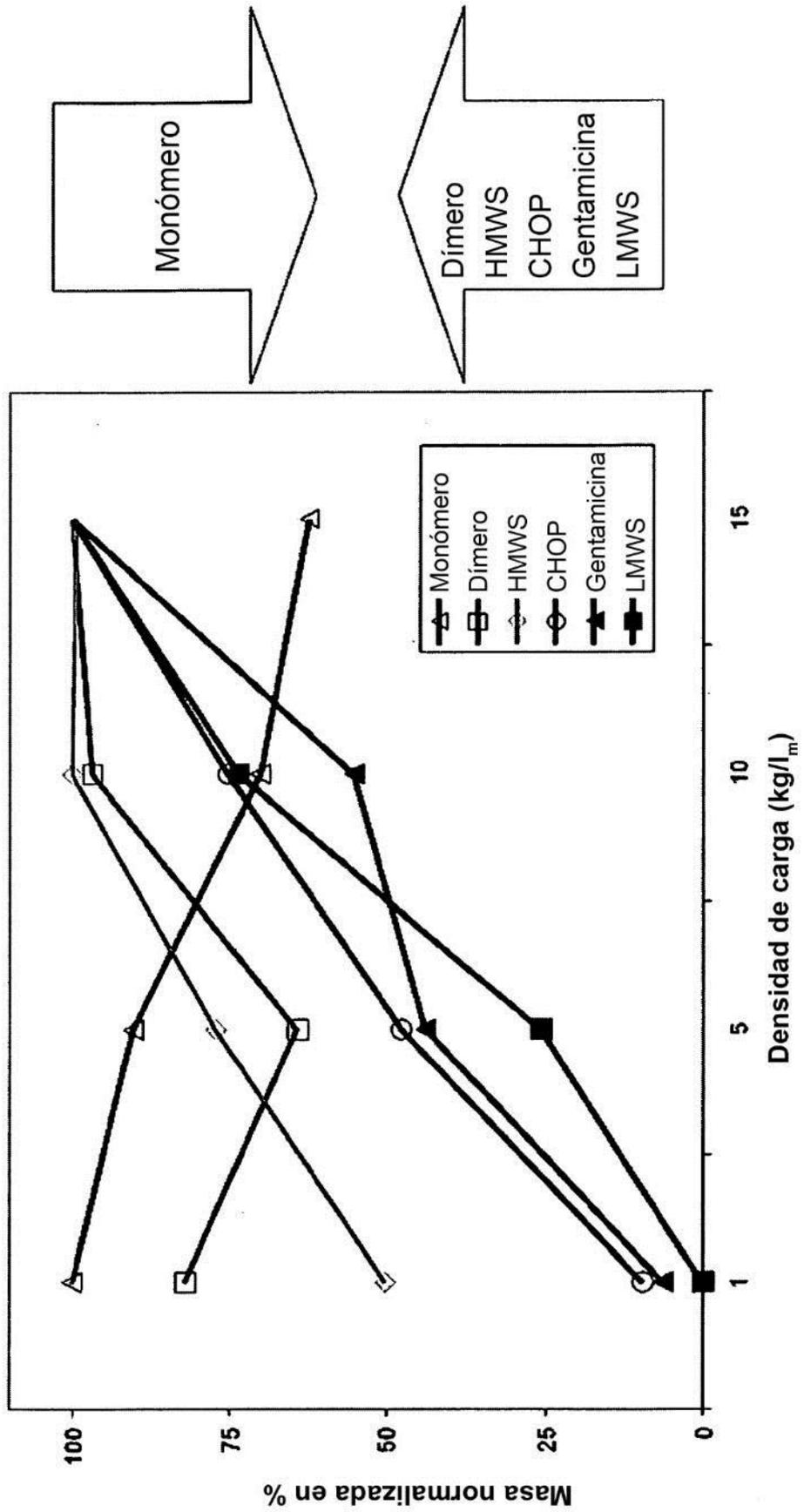
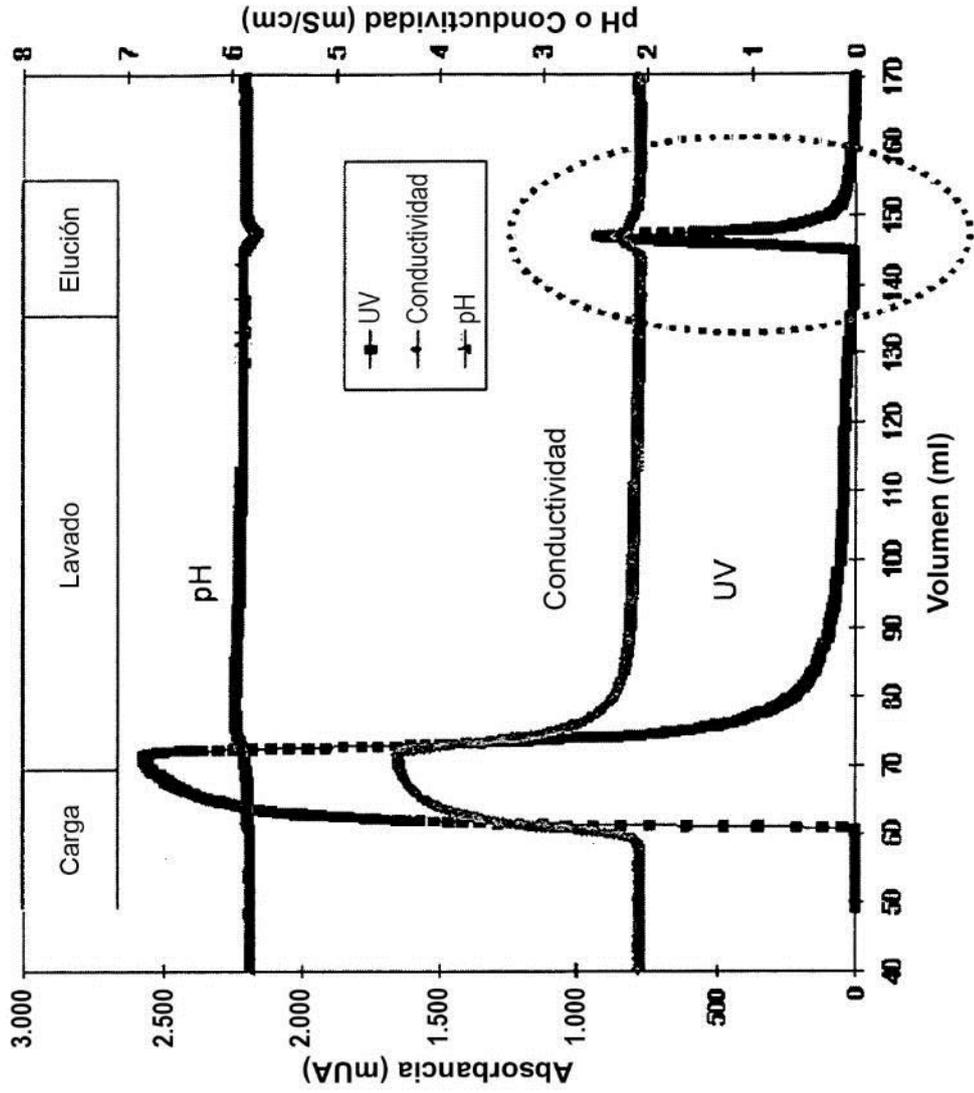


Figura 9



Mustang S Acrodisc
1333 VM/h

Tampón de lavado
Acetato 20 mM
pH 5,4, 1,9 mS/cm

Tampón de elución
Lavado + 2 mg/ml gent.
pH 5,4, 1,9 mS/cm

Figura 10

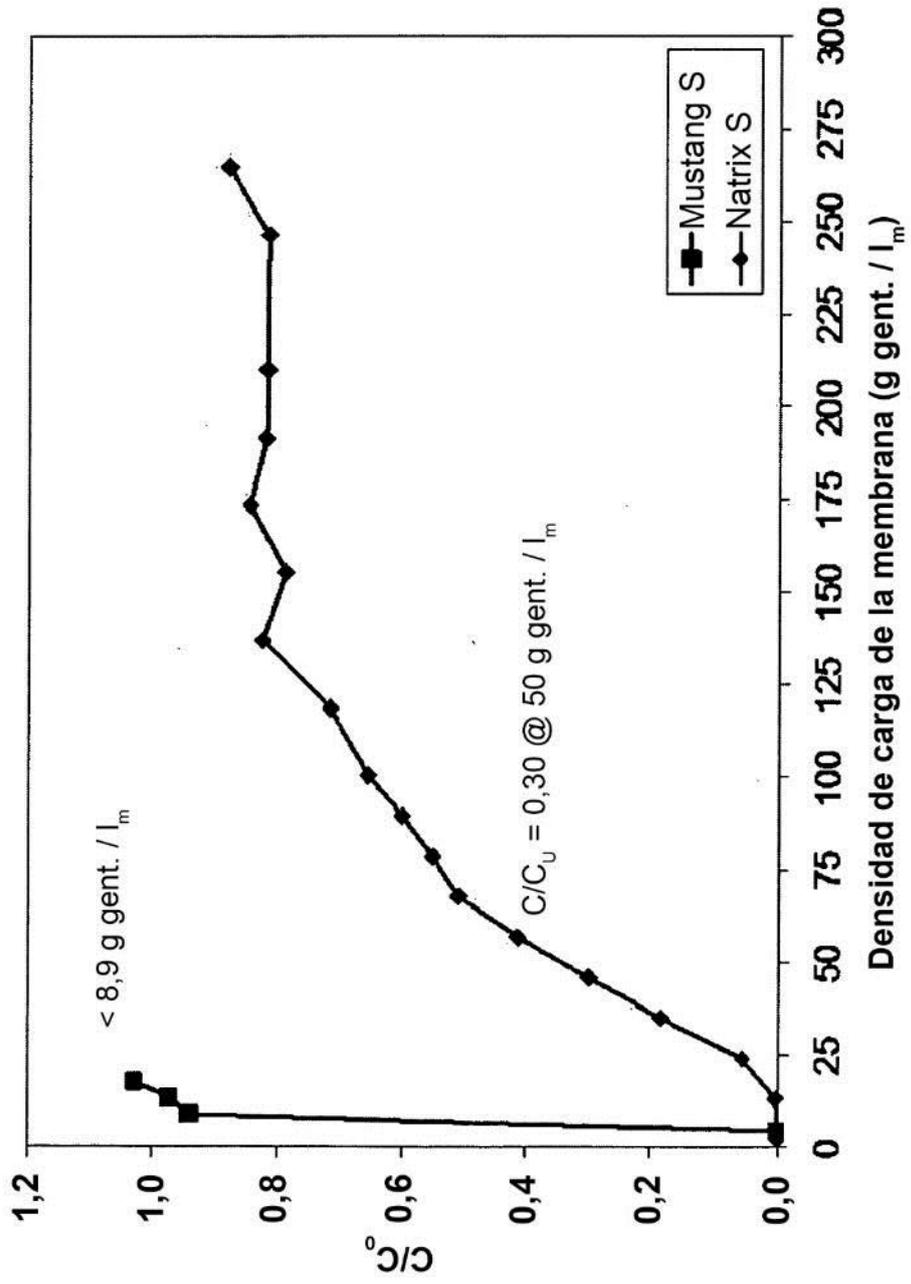


Figura 11

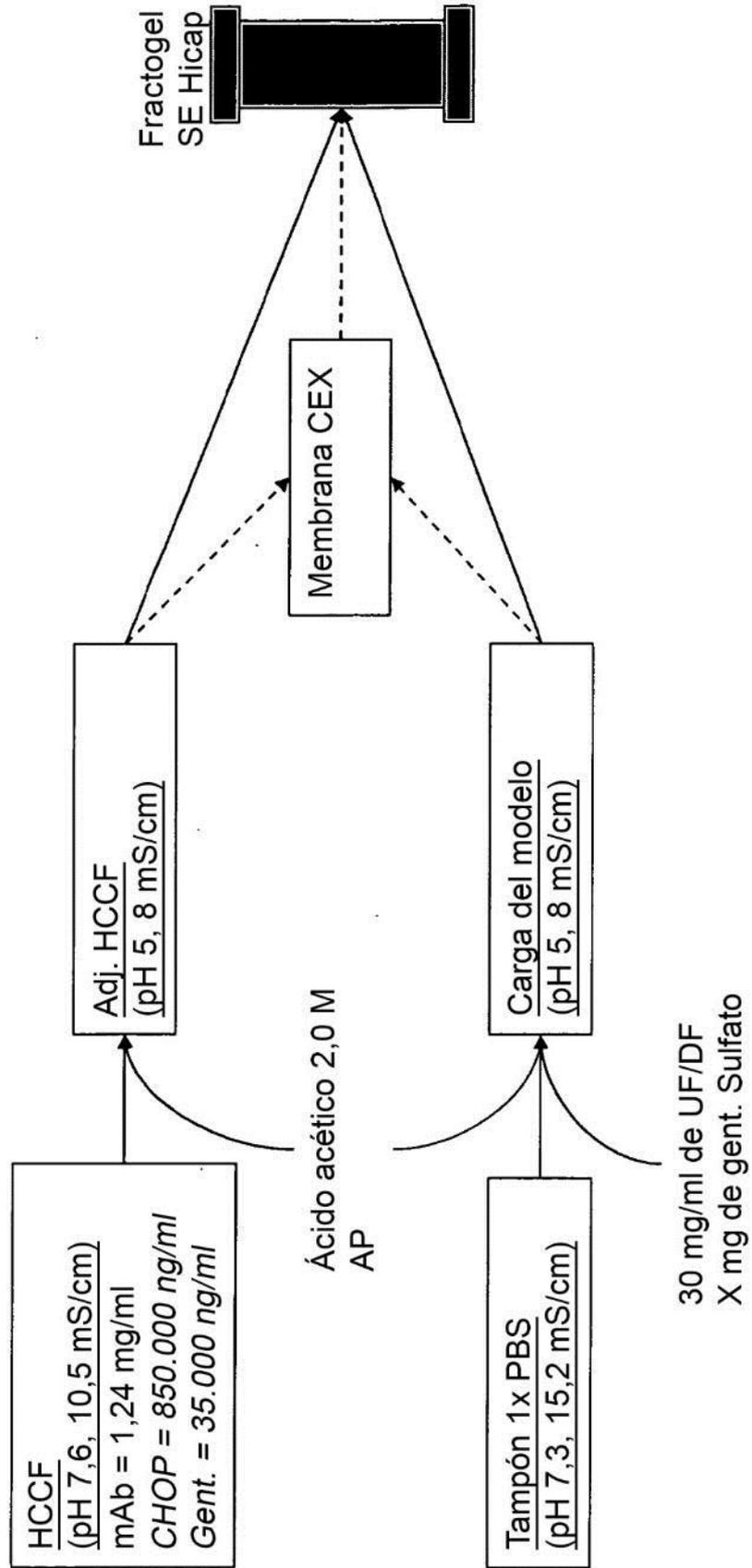


Figura 12

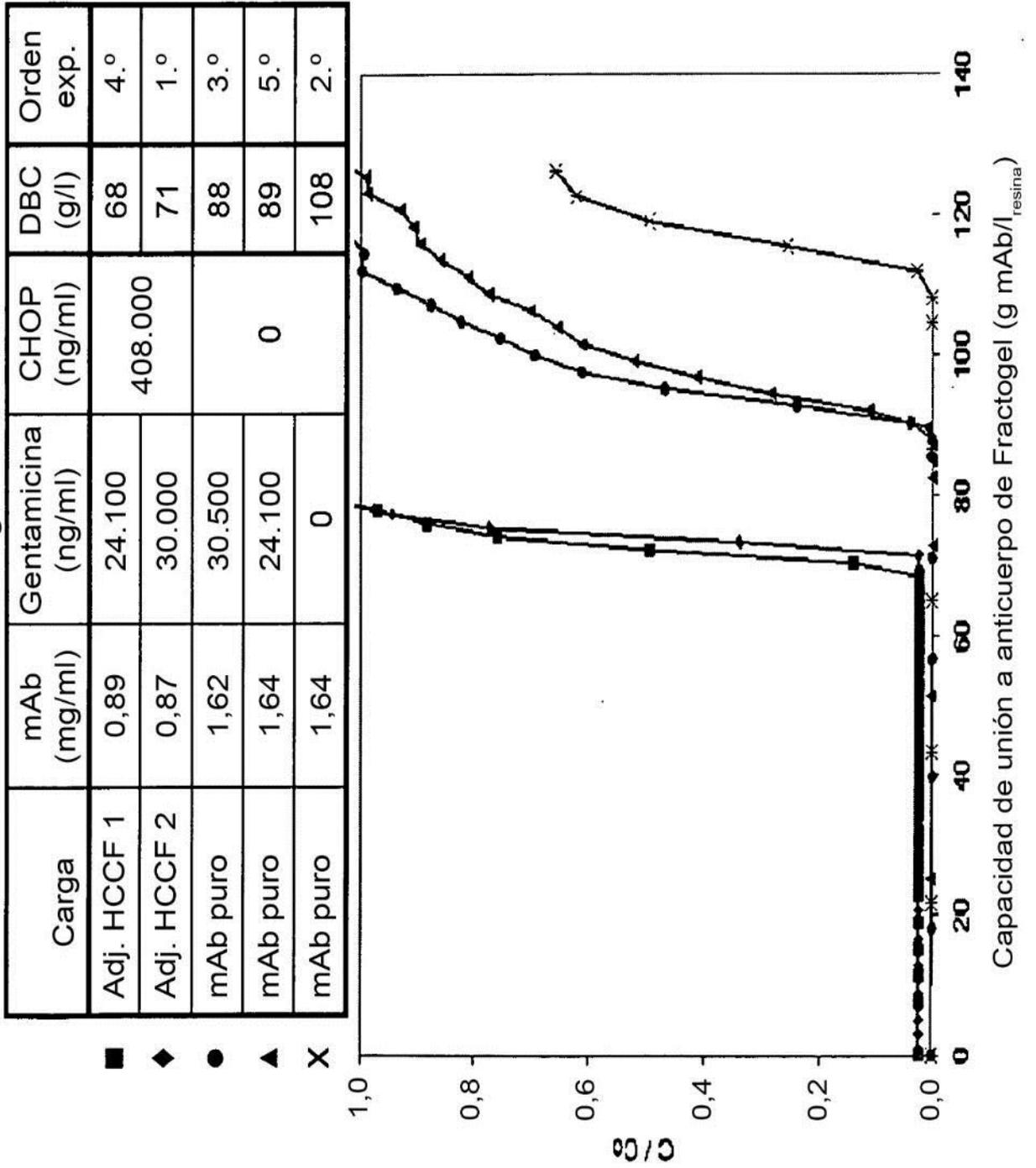
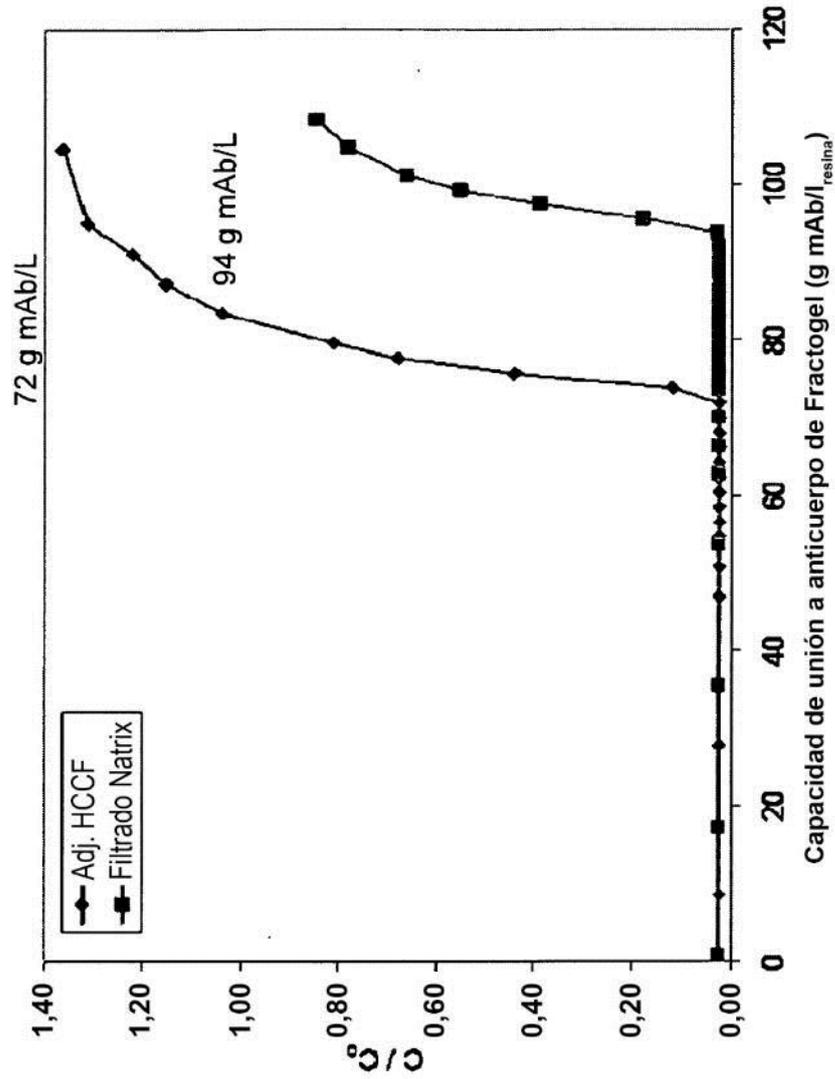


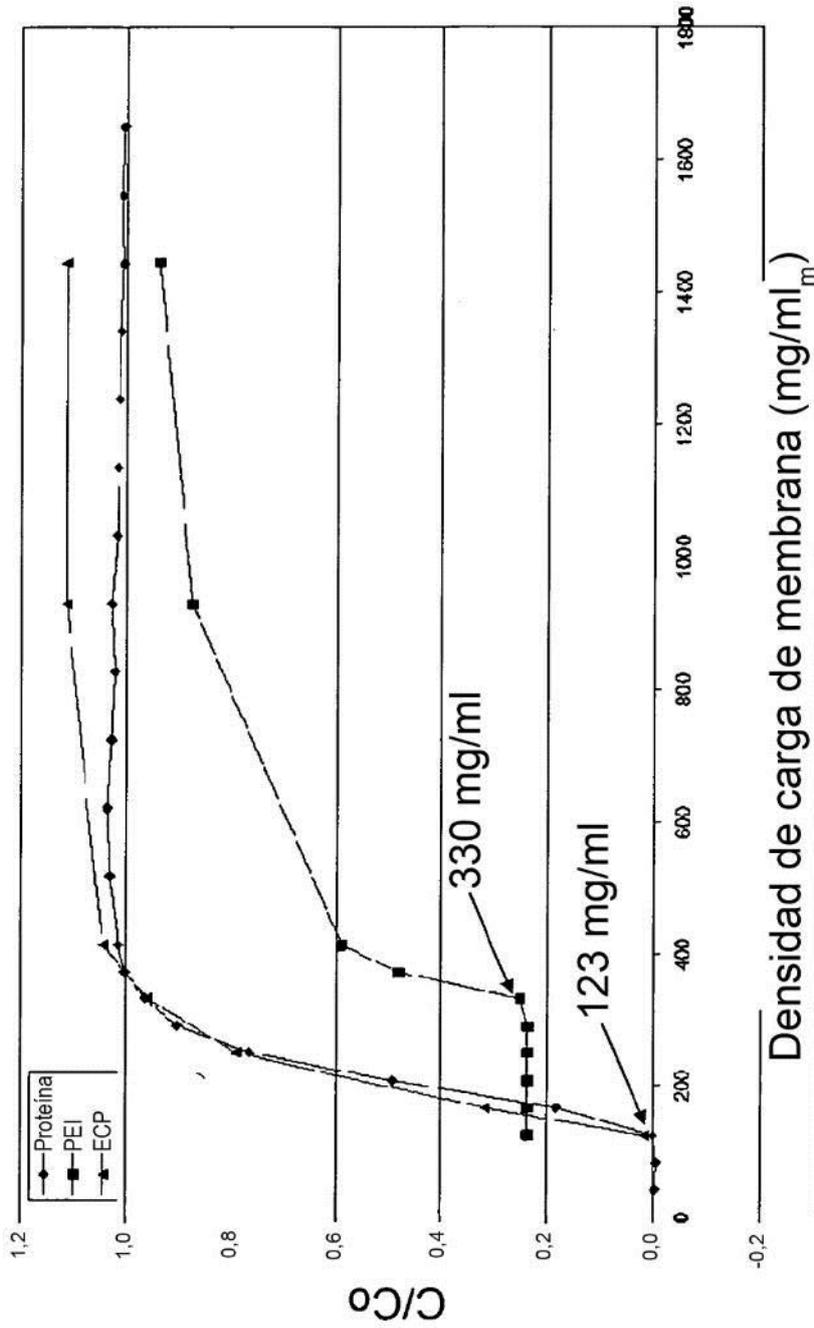
Figura 13



	Adj. HCCF	Flujo continuo Matrix
mAb (mg/ml)	0,88	0,83
CHOP (ng/ml)	408.000	328.000
Gent. (ng/ml)	24.100	870

Figura 14

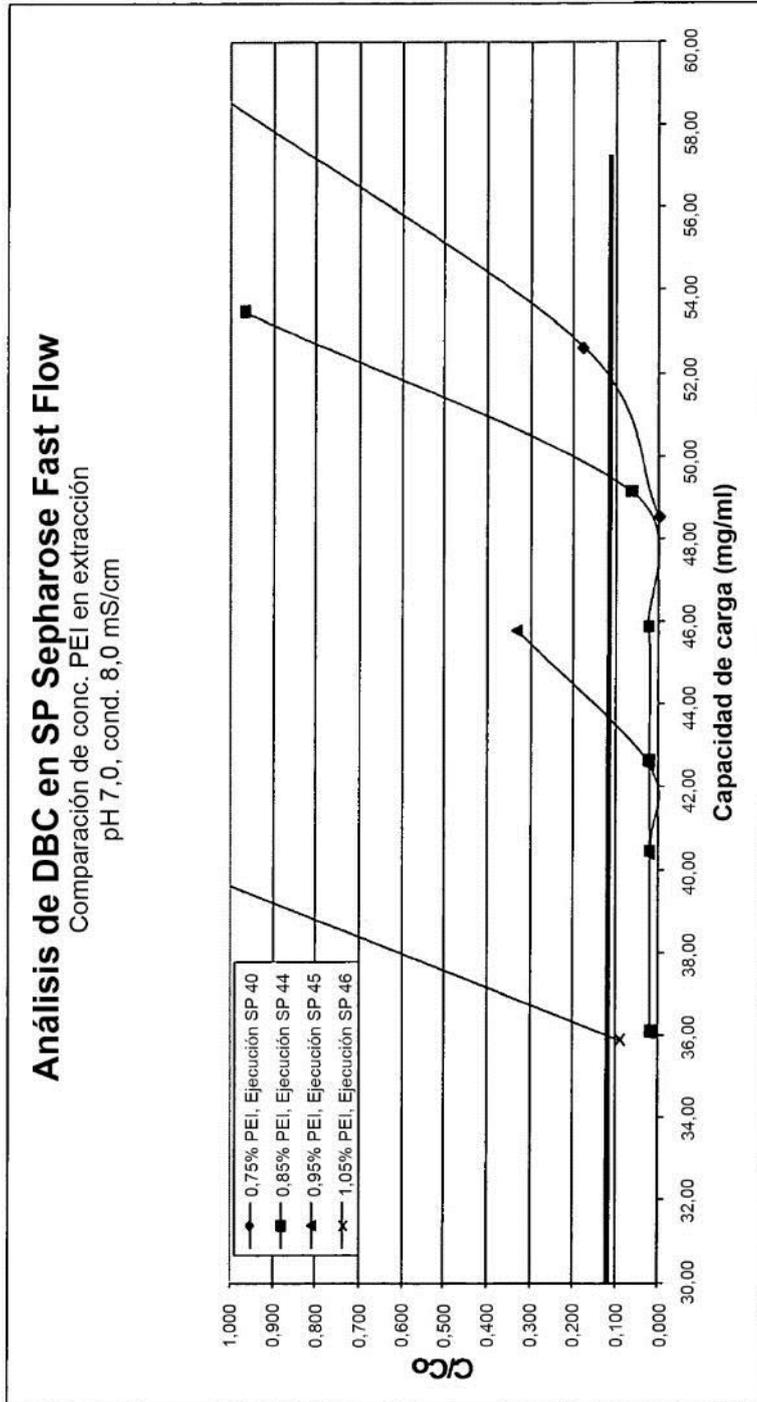
Unión a Natix S



Densidad de carga de membrana (mg/ml_m)

Carga	Proteína diana (mg/ml)	ECP (ng/ml)	PEI (µg/ml)
Mezcla de proteína A	4,7	8.870	130

Figura 15



Ejecución	40	44	45	46
PEI añadido antes de recogida (%)	0,75	0,85 %	0,95 %	1,05 %
Capacidad de unión dinámica (g/l) al 10 % de ruptura	51	49	43	36

Figura 16

Ejecución	Condición previa a recogida	Carga de proteína (mg/ml)	SP Sepharose Fast Flow			
			Rendimiento de etapa (%)	Mezcla de ECP (ng/mg)	Mezcla de agregado (%)	Mezcla de dímero (%)
<i>Efecto de la concentración de PEI</i>						
29	0,60 % PEI	6,9	88	155	2,5	3,7
	0,70 % PEI	6,6	96	145	7,5	3,8
	0,80 % PEI	7,3	93	247	5,4	3,4
	0,90 % PEI	7,5	91	274	3,5	3,3
	1,00 % PEI	7,3	81	621	6,8	5,0
	1,10 % PEI	7,4	70	904	17,3	5,9