

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 487**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2012 PCT/EP2012/062014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13189544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012 E 12728608 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2864346**

54 Título: **Método de purificación de un anticuerpo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.03.2019**

73 Titular/es:  
**SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B.V. (100.0%)  
Microweg 22  
6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:  
**KOKKE, BASTIAAN PIETER ARIAN;  
VAN WIJK-BASTEN, EVERDINA JOSEPHINA  
WILHELMINA;  
DE BEIJER, THOMAS ANTONIUS BERNARDUS;  
EPPINK, MICHEL HENDRIKUS MARIA y  
MARZÁ PÉREZ, MARIA**

74 Agente/Representante:  
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 704 487 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

Método de purificación de un anticuerpo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de purificación de un anticuerpo. En particular, los métodos implican el uso en último estadio de cromatografía de intercambio aniónico en un procedimiento de purificación de anticuerpos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son unos de los agentes más importantes en la industria farmacéutica. Los mAb normalmente se producen utilizando células cultivadas, siendo las células de mamífero las que se utilizan a menudo para asegurar el plegamiento y glicosilación deseados. Durante la última década, se han hecho avances en la tecnología de cultivos, incluyendo la mejora de la media de producción y estrategias de alimentación. Estos avances han dado como resultado títulos de cultivo celular altos. Los anticuerpos expresados, sin embargo, generalmente tienen que separarse de las células huésped y otros componentes (impurezas) del medio de expresión con el fin de utilizarse para los fines que se pretenden.

Debido a que los mAb se producen en general por fermentación, están acompañados de grandes cantidades de impurezas relacionadas con el procedimiento tales como proteínas de las células huésped (HCP), ADN de la célula huésped, y componentes del medio. Las células de mamífero, por ejemplo, son sensibles a la rotura debido a la fuerza de cizallamiento, y esto puede dar como resultado la liberación de impurezas, tales como las proteasas (es decir, una HCP), que pueden afectar la estabilidad y/o pureza del producto. Las HCP en particular son un contaminante importante debido a que provocan una respuesta inmunitaria a un nivel de pocas partes por millón. Dependiendo de las condiciones de fermentación, las impurezas relacionadas con el producto tal como los mAb degradados, truncados y agregados, también se pueden encontrar en el sobrenadante del cultivo. La recuperación y purificación de anticuerpos eficaz del medio de cultivo celular, por lo tanto, es una parte importante del procedimiento de purificación de anticuerpos, especialmente en aplicaciones farmacéuticas.

Los procedimientos de purificación de mAb actuales cuentan en general con etapas de pulido cromatográfico que se dirigen a la reducción/retirada de impurezas relacionadas con el producto y relacionadas con el procedimiento, tal como las HCP y el ADN, agregados de alto peso molecular (PM), productos de degradación de bajo PM y que se pueden lixiviar. Los procedimientos de purificación pueden desglosarse en una serie de operaciones unitarias, aunque las operaciones (y sus etapas) pueden producirse simultánea o secuencialmente. Un procedimiento de purificación de anticuerpos basado en la Proteína A común, que cubre un amplio margen de anticuerpos y condiciones, comprende las siguientes operaciones unitarias: captura en Proteína A → inactivación vírica a bajo pH → pulido por cromatografía de intercambio iónico (IEX) (normalmente dos cromatografías de intercambio iónico seguidas por una cromatografía de intercambio aniónico) → filtración vírica → y una última de ultrafiltración-diafiltración (UF/DF). Un método de este tipo se describe en el documento WO 2011/015920. Los detalles adicionales de las técnicas de purificación de anticuerpos se pueden encontrar en Process Scale Purification of Antibodies, Editado por Uwe Gottschalk, John Wiley & Sons, Inc. 2009. La etapa final de UF/DF se considera que completa la purificación y coloca al anticuerpo en una composición adecuada para aplicaciones de uso final, tal como la carga en volumen y acabado, liofilización para aplicaciones farmacéuticas, ensayos *in vivo*, uso clínico, etc.

En consecuencia, sería deseable proporcionar un procedimiento de purificación alternativo para purificar una composición de anticuerpos.

**Breve resumen de la invención**

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa en los descubrimientos de que los procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales no son tan eficaces como se creía previamente, especialmente con respecto a las HCP, y que el uso de la cromatografía de intercambio aniónico (AEX) al final del procedimiento de purificación puede mejorar el procedimiento de purificación y/o proporcionar composiciones de anticuerpos de mayor calidad. En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de purificación de una composición de anticuerpo, que comprende someter una composición de anticuerpos purificado con UF/DF a una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para formar una composición de anticuerpos farmacéuticamente pura. "Farmacéuticamente pura" en este contexto se define posteriormente en el presente documento. La composición de anticuerpo purificada con UF/DF que se describe en el presente documento normalmente tiene una concentración de anticuerpo de al menos 1 mg/ml, tal como al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, 5 a 250 mg/ml, 10 a 150 mg/ml, 15 a 100 mg/ml, 20 a 50 mg/ml, y 30-35 mg/ml. La composición de anticuerpo purificada por UF/DF se obtiene normalmente sometiendo la composición de anticuerpo parcialmente purificada a una UF/DF. La composición de anticuerpo parcialmente purificada puede formarse por una etapa(s) de captura y/o pulido.

65

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de purificación de una composición de anticuerpo, que comprende: someter una recolección de anticuerpo de un medio de cultivo a cromatografía de afinidad, tal como una cromatografía con Proteína A, para capturar una composición de anticuerpo en bruto; someter la composición de anticuerpo en bruto al menos a una etapa de pulido para formar una composición de anticuerpo parcialmente purificada; someter la composición de anticuerpo parcialmente purificada a una etapa de UF/DF para formar una composición de anticuerpo purificada por UF/DF; y someter la composición de anticuerpo purificada por UF/DF a una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para formar una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura. La etapa de pulido a menudo es una cromatografía de intercambio catiónico y seguida opcionalmente por una cromatografía de intercambio aniónico.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método de purificación de una composición de anticuerpo, que comprende someter una composición de anticuerpo que tiene una concentración de anticuerpo de al menos 1 mg/ml, tal como al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, 5 a 250 mg/ml, 10 a 150 mg/ml, 15 a 100 mg/ml, 20 a 50 mg/ml, y 30-35 mg/ml, y que tiene un tampón y pH parenteralmente aceptables, a una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) suficiente para reducir la cantidad de proteínas de la célula huésped en dicha composición de anticuerpo.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de purificación de un anticuerpo utilizando una AEX en último término en la purificación, con respecto a las técnicas de purificación conocidas previamente. Los procedimientos de purificación de mAb convencionales que utilizan una etapa de captura seguida por las etapas de pulido con IEX y terminando con una etapa final de UF/DF antes de la carga en volumen, se pensaba que eran suficientes para conseguir niveles deseablemente bajos de HCP. Los kits de detección de HCP basados en ELISA comunes a menudo mostraban adecuadamente bajas cantidades de HCP después de la etapa final de UF/DF. Pero después de cambiar a un nuevo kit de detección de HCP basado en ELISA más sensible, los presentes inventores descubrieron que la cantidad de HCP era actualmente mucho mayor de lo que se pensaba previamente y más allá del límite de pureza deseado. Basándose en este descubrimiento, los inventores quisieron encontrar un procedimiento de purificación que proporcionara una composición de anticuerpo de pureza más alta.

Los inventores descubrieron que la AEX se puede llevar a cabo después de la etapa final de UF/DF con efectos de purificación mejorada. Como se muestra en los Ejemplos posteriores, al mover el estadio de pulido pre- UF/DF a post-UF/DF proporcionaba una retirada superior de HCP sin el aumento no deseado de otras impurezas medidas. La localización de la etapa de AEX después de la UF/DF aumentaba el efecto de purificación en comparación con los procedimientos convencionales. Llevar a cabo la AEX después de la última ultrafiltración también es ventajoso desde una perspectiva económica y de ahorro de tiempo. La etapa de AEX se puede llevar a cabo en general más rápido después de la UF/DF que antes (es decir, durante la fase de pulido) debido a que la composición de anticuerpo está más concentrada después de la UF/DF final (por ejemplo, menos volumen). Otro beneficio de la invención es el aumento del control vírico; se sabe que la AEX retira algunos virus. Cuando se lleva a cabo la AEX en una etapa de pulido (pre- UF/DF) el procesamiento y manejo posterior tiene el riesgo de reintroducción de virus. Ese riesgo se puede minimizar llevando a cabo la AEX después en el esquema de purificación.

En una realización, una composición de anticuerpo purificada por UF/DF se somete a una AEX. Una "composición de anticuerpo purificada por UF/DF" es la que se somete a algún nivel de purificación y se ha sometido a una etapa de UF/DF. En el procedimiento de purificación típico de la técnica anterior descrito anteriormente, la etapa de UF/DF final produce una composición de anticuerpo purificada por UF/DF. No es necesario que la composición sea, y normalmente no es, completa o suficientemente pura. Más bien, se ha llevado a cabo la retirada de impurezas hasta cierto nivel y alguna concentración de la composición de anticuerpo cuando ocurre la UF/DF. Esto distingue la composición de anticuerpo purificada por UF/DF como se utiliza en la presente invención de una composición de anticuerpo que se ha sometido a UF/DF antes de la captura; por ejemplo, como parte de una etapa de clarificación o preparatoria para facilitar la etapa de captura, al menos debido a que dichas etapas de clarificación o preparatorias dan como resultado una composición de una concentración insuficientemente baja que no es adecuada para su uso final. Dicha composición de anticuerpo también es normalmente de concentración baja.

La composición de anticuerpo purificada con UF/DF de la presente divulgación normalmente tiene una concentración de anticuerpo de al menos 1 mg/ml, más normalmente al menos 5 mg/ml, preferentemente al menos 10 mg/ml, incluyendo al menos 15 mg/ml. Por razones prácticas, la concentración de anticuerpo no es normalmente mayor de 250 mg/ml. En consecuencia, la concentración de anticuerpo está normalmente en el intervalo de 5 a 150 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración está en el intervalo de 10 a 65 mg/ml incluyendo de 15 a 50 mg/ml, tal como de 30 a 35 mg/ml. En otras realizaciones, la concentración de anticuerpo está en el intervalo de 50 a 150 mg/ml, incluyendo de 75 a 100 mg/ml.

En algunas realizaciones, la composición de anticuerpo purificada por UF/DF de la presente invención contiene el anticuerpo en un tampón y pH parenteralmente aceptable. Normalmente, la concentración de anticuerpo es al menos de 10 mg/ml en dicha realización e incluye los intervalos mencionados anteriormente, por ejemplo, de 15 a 50 mg/ml, tal como de 30 a 35 mg/ml. Convencionalmente, el tratamiento de una composición de anticuerpo cerca

de la forma final (por ejemplo, que tenga un medio tampón adecuado para la inyección farmacéutica) con una etapa de cromatografía para una purificación adicional es contra intuitivo. La etapa de UF/DF se consideraba la etapa final y situaba la composición de anticuerpo purificada a la concentración y tampón apropiados. Las etapas de purificación adicionales post- UF/DF se consideraban una desventaja, por ejemplo, debido al alto coste asociado con la pérdida de rendimiento en los últimos estados y/o debido al riesgo de introducir lixiviables o extractables tardíos en el procedimiento de purificación.

Un tampón parenteralmente aceptable es una composición acuosa, que normalmente contiene un tampón de acetato, fosfato, histidina, y/o citrato, en cantidades adecuadas para la administración parenteral, normalmente 1-50 milimolar. El pH de la composición es igualmente consistente con las formulaciones parenterales y la administración y está normalmente en el intervalo de un pH de 4 a 8, preferentemente un pH de 6 a 8. Por el contrario, el tampón parenteralmente aceptable no contiene cantidades peligrosas o parenteralmente inaceptables de reactivos de purificación anteriores. En algunas realizaciones, la composición de tampón parenteralmente aceptable comprende adicionalmente un tensioactivo y/o un estabilizador del anticuerpo.

Por la presente invención, la composición de anticuerpo purificada por UF/DF se somete a AEX. Por claridad, la cromatografía de intercambio aniónico o "AEX" se refiere a un método por el cual una composición que comprende un anticuerpo y una o más impurezas (por ejemplo, impurezas relacionadas con el procesamiento, tales como proteínas de la célula huésped, ADN, y/o virus endógenos o adventicios (por ejemplo, MuIV o MVM) se pueden separar basándose en diferencias de carga utilizando una matriz de intercambio aniónico. Una matriz de intercambio aniónico comprende en general grupos cargados positivamente, unidos covalentemente. Se pueden emplear matrices de intercambio aniónico fuertes o débiles. Ejemplos de matrices de intercambio aniónico fuertes incluyen las que tienen un ion de amonio cuaternario. Ejemplos de matrices de intercambio aniónico débiles incluyen los que tienen un grupo amina funcional terciario o secundario, tal como DEAE (dietilaminoetil). En ciertas realizaciones, se pueden utilizar matrices de intercambio aniónico multimodal, que incorporan mecanismos de unión adicionales, así como las interacciones iónicas, por ejemplo, una o más interacciones de enlace de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Ejemplos de matrices de intercambio aniónico se conocen en la técnica, y pueden incluir, pero no se limitan a Sartobind Q, Natrix Q, Chromasorb Q, y Mustang Q. La Mustang Q es una matriz de intercambio aniónico preferida.

El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico se emplea en modo de flujo directo con respecto al anticuerpo, como es bien conocido en la técnica. El modo de flujo directo significa que el anticuerpo de interés no se adsorbe significativamente a la matriz de intercambio aniónico, mientras que la una o más impurezas se adsorben (o se les impide) a la matriz. El anticuerpo fluye a través de la columna mientras que las impurezas se unen, causando de esta manera una separación de las impurezas del anticuerpo. Periódicamente la matriz necesitará rejuvenecerse retirando las impurezas unidas o reemplazando con nuevo material de matriz.

En la presente invención, la aplicación de AEX tiene un efecto purificante en la composición de anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpo purificada por UF/DF se convierte en una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura después de someterse a la AEX de acuerdo con la invención. Una "composición de anticuerpos farmacéuticamente pura" como se utiliza en el presente documento significa una composición cuyas impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo, oligómeros, etc.) y las impurezas relacionadas con el procesamiento (por ejemplo, el ADN de la célula huésped y HCP, etc.) están por debajo de niveles farmacéuticamente aceptables. Dichos niveles son los que se aceptan generalmente por los trabajadores en el campo farmacéutico para una composición que se va a administrar a un ser humano o animal. Para un producto de anticuerpo aprobado, la referencia adoptada por la FDA de EE. UU. O la EMA de Europa para limitar dichas impurezas puede definir el límite superior de farmacéuticamente puro (si hay diferentes límites entre EE. UU. y la UE, el que esa mayor). En general una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura no necesita purificación adicional de impurezas relacionadas con el producto o relacionadas con el procesamiento, pero puede necesitar la filtración estéril u otras modificaciones para formar la formar de dosificación final. En resumen, el acto de purificación está esencialmente completo. En realizaciones, una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura de acuerdo con la presente invención satisfará normalmente las siguientes especificaciones: (1) concentración de HCP de 10 ppm (partes por millón) o menos, preferentemente 5 ppm o menos, y más preferentemente 2 ppm o menos; y (2) una concentración de ADN de 20 ppb (partes por mil millones) o menos, preferentemente 10 ppb o menos, más preferentemente 5 ppb o menos y a menudo menos de 1 ppb. Si se utiliza corriente arriba la Proteína A u otro reactivo proteico en el procedimiento de purificación, entonces se desea habitualmente que la cantidad de Proteína A (lixiviada) se limite a una concentración de 30 ppm o menos, normalmente 10 ppm o menos, a menudo 5 ppm o menos, y en algunas realizaciones 1 ppm o menos. También, en algunas realizaciones, la composición de anticuerpo farmacéuticamente pura tendrá normalmente no más de un 5 % de dímeros y agregados, preferentemente no más de un 2 %, y a menudo no más de un 1 %, basándose en la cantidad total de anticuerpo, dímeros y agregados. La cantidad de dichas impurezas se puede expresar también con respecto a la cantidad de anticuerpo. Por ejemplo, la cantidad de HCP en la composición de un anticuerpo farmacéuticamente pura es normalmente menor de 10 ng/mg de anticuerpo, preferentemente menor de aproximadamente 5 ng/mg, más preferentemente menos de aproximadamente 2 ng/mg.

Las condiciones adecuadas para llevar a cabo la etapa de AEX se conocen en general en la técnica y se pueden determinar u optimizar utilizando la experiencia de rutina y los procedimientos. La etapa de AEX como se utiliza en la presente invención reduce la concentración o cantidad de al menos una impureza. Por lo tanto, una composición de anticuerpo purificada por UF/DF se transforma en una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura  
 5 sometiénndola a una AEX y de esta manera se reduce al menos una impureza. Normalmente, aunque no necesariamente, la impureza que se va a reducir es una HCP. Una realización particular de la presente invención comprende someter una composición de anticuerpo purificada por UF/DF (que tenga una concentración de al menos 10 mg/ml y un tampón y pH parenteralmente aceptables) a una AEX con el fin de reducir la concentración o cantidad  
 10 de un HCP. En todas las realizaciones el grado de reducción no se limita particularmente e incluye mejoras pequeñas pero detectables de pureza, tal como desde 25 ppm a 20 ppm para cumplir de esta manera una especificación de pureza, etc. Normalmente, sin embargo, la magnitud del aumento de pureza es más significativo.

Los anticuerpos que se pueden purificar en la presente invención no están particularmente limitados. Por claridad, un "anticuerpo" se toma en su sentido más amplio e incluye cualquier inmunoglobulina (Ig), variantes activas o  
 15 deseadas de la misma, y fragmentos activos o deseables de la misma (por ejemplo, fragmentos Fab, anticuerpos de camélido (anticuerpos de cadena sencilla), y nanocuerpos). El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal y puede ser de origen natural o producido recombinantemente. Por lo tanto, los anticuerpos humanos, no humanos, humanizados, y quiméricos están todos incluidos en el término "anticuerpo". Normalmente el anticuerpo que se va a purificar en el procedimiento de la invención es un anticuerpo monoclonal de una de las siguientes clases: IgG, IgE,  
 20 IgM, IgD, e IgA; y más normalmente es una IgG o IgA. El anticuerpo se puede dirigir contra varios antígenos, como se conoce bien en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a un antígeno relacionado con el cáncer (por ejemplo, HER-2) o un antígeno pro-inflamatorio (por ejemplo, una citocina pro-inflamatoria, tal como el TNF- $\alpha$ ). Ejemplos de anticuerpos antiinflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , tales como adalimumab, infliximab, etanercepto, tolimumab, y certolizumab pegol; anticuerpos anti-IL-1 beta tales como canakinumab; anticuerpos anti-IL-12/23 (p40) tales como ustekinumab y briakinumab; y anticuerpos anti-IL-2R, tales como daclizumab. Ejemplos de anticuerpos anti-cáncer incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-BAFF tales como belimumab; anticuerpos anti CD20 tales como rituximab; anticuerpos anti-CD22 tales como epratuzumab; anticuerpos anti-CD25 tales como daclizumab; anticuerpos anti-CD30 tales como iratumumab; anticuerpos anti-CD33 tales como el gemtuzumab; anticuerpos anti-CD52 tales como alemtuzumab; anticuerpos anti-CD152 tales como ipilimumab; anticuerpos anti-EGFR tales como cetuximab; anticuerpos anti-HER2 tales como trastuzumab y pertuzumab; anticuerpos anti-IL-6 tales como siltuximab; y anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab.  
 30

Los anticuerpos se producen rutinariamente o se expresan en células en un medio de cultivo. Las células pueden ser células bacterianas, vegetales o de mamífero como se sabe bien en la técnica. En una realización de la invención el anticuerpo se produce en células eucariotas, por ejemplo, en células de mamífero. Un experto en la técnica puede seleccionar una línea celular apropiada dependiendo del anticuerpo particular de interés. Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, las células CHO, VERO, BHK, HeLa, CV1, MDCK, 293, 3T3, C127, PC12, HEK-293, PER C6, Sp2/0, NSO, W138 y líneas celulares de mieloma (especialmente murinas). Las células de mamífero derivadas de cualquiera de las células anteriores también se pueden utilizar. En una realización de la invención, el anticuerpo se produce en células CHO.  
 35  
 40

El medio de cultivo en el que las células producen los anticuerpos se conoce bien en general y lo puede determinar un experto en la técnica. Normalmente, el medio se diseña basándose en las necesidades específicas de una célula huésped y el clon, como se conoce bien en la técnica. El medio puede contener varios ingredientes tales como sales inorgánicas, carbohidratos (por ejemplo, azúcares tales como glucosa, galactosa, maltosa o fructosa), aminoácidos, vitaminas (por ejemplo, vitaminas del grupo B (por ejemplo, B12), vitamina A, vitamina E, riboflavina, tiamina, y biotina), ácidos grasos y lípidos (por ejemplo, colesterol y esteroides), proteínas y péptidos o dipéptidos (por ejemplo, albúmina, transferrina, fibronectina y fetuina), suero (por ejemplo, composiciones que comprenden albúminas, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento, tales como suero fetal bovino, suero de ternera recién nacida y suero de caballo), elementos traza (por ejemplo, zinc, cobre, selenio, e intermediarios de ácido tricarbóxico) y combinaciones de los mismos. El medio contiene frecuentemente un tampón y los tampones comunes que se encuentran incluyen PBS, BSS de Hank, sales de Earles, DPBS, HBSS, EBSS. Otros componentes que se encuentran en el medio de cultivo pueden incluir ascorbato, citrato, cisteína/cistina, glutamina, ácido fólico, glutatión, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido lipoico, ácido oleico, ácido palmítico, piridoxal/piridoxina, riboflavina, selenio, tiamina, transferrina. Los medios de cultivo están disponibles en el mercado en, por ejemplo, Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Mo.), HyClone (Logan, Utah), Invitrogen Corporation (Carlsbad, Calif.), Cambrex Corporation (E. Rutherford, N.J.), JRH Biosciences (Lenexa, Kans.), Irvine Scientific (Santa Ana, Calif.), y otros.  
 45  
 50  
 55

La producción de anticuerpos normalmente da como resultado la presencia de grandes cantidades de material no deseado. Por ejemplo, impurezas relacionadas con el procesamiento tal como las HCP, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN cromosómico y extracromosómico; ácido ribonucleico (ARN-t o ARNm)) y lípidos (por ejemplo, material de la pared celular) son ejemplos de materiales no deseados (desechos celulares) de las células productoras de anticuerpos (también conocidas como "células huésped"). Además, los componentes del medio tal como toros tampones, aditivos de medio, o contaminantes microbianos (por ejemplo, bacterias y/o virus) también son materiales no deseados que deberían separarse del anticuerpo que se pretende. Las impurezas relacionadas con el producto tales como multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, etc.), formas truncadas, y formas  
 60  
 65

aglomeradas (por ejemplo, formas mal plegadas o desnaturalizadas) del anticuerpo pretendido son normalmente materiales no deseados. Se hace referencia a estos materiales no deseados en una composición de anticuerpo como impurezas. La composición de anticuerpo obtenida inmediatamente después de la producción (cultivo) es generalmente el menos concentrado y el que tiene más impurezas. Esta composición de anticuerpo inicial o en bruto se somete a purificación para recuperar el anticuerpo pretendido apartado de una o más impurezas. Habitualmente, la purificación implica al menos una etapa de captura y a menudo al menos una etapa de pulido para formar una composición de anticuerpo parcialmente purificada.

Antes de la etapa de captura, la composición de anticuerpo en bruto a veces se clasifica por procedimientos convencionales. Por conveniencia, se hace referencia colectivamente a las composiciones de anticuerpo en bruto y clarificadas como la "composición de anticuerpo inicial", independientemente de si la composición de anticuerpo está clarificada.

La etapa de captura es bien conocida en la técnica. El objetivo es aislar rápidamente, estabilizar y concentrar el anticuerpo. Idealmente, las impurezas críticas o perjudiciales que podrían afectar adversamente la actividad o rendimiento se retiran en un grado alto. Las técnicas adecuadas para llevar a cabo la etapa de captura incluyen distintos tipos de cromatografía, tales como la cromatografía de afinidad (AC), interacción hidrófoba (HIC), intercambio iónico (IEX) (tal como la cromatografía de intercambio catiónico (CEX)), cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), y cromatografía de modo mixto. La composición de anticuerpo obtenida después de la etapa de captura es una "composición de anticuerpo parcialmente purificada" para los fines de la presente invención. Por conveniencia de nomenclatura, a veces también se hace referencia a esta composición de anticuerpo capturada como una "composición de anticuerpo en bruto".

La composición de anticuerpo en bruto se puede someter a una o más etapas de pulido. El objetivo del pulido es retirar el grueso de las impurezas. Las técnicas adecuadas para el pulido incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), y cromatografía de hidroxiapatita.

Aunque las técnicas anteriores se conocen bien en la técnica, la cromatografía de afinidad (para la captura) y la IEX (para captura y/o pulido), son dos de las técnicas preferidas, que se describen con más detalle posteriormente.

La cromatografía de afinidad se refiere a un método de separación por el que un anticuerpo, gracias a sus propiedades de unión específicas, se une a un ligando de afinidad para el anticuerpo. El ligando de afinidad funcional puede inmovilizarse en un soporte sólido o semisólido de manera que cuando una composición que comprende el anticuerpo se pasa sobre el ligando y el soporte sólido, el anticuerpo que tiene una afinidad de unión específica por el ligando adsorbe el ligando, y una o más de otras impurezas no se adsorben (o se unen con baja afinidad) y se separan del anticuerpo. Ejemplos de impurezas que no se unen normalmente (o no se unen bien) incluyen impurezas relacionadas con el procesamiento (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, componentes medios) y algunas impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo). En algunas realizaciones, el soporte sólido que comprende el ligando se lava una o más veces con un tampón para retirar las impurezas adicionales antes de que el anticuerpo adsorbido se retire del ligando y el soporte. Después de retirar una o más impurezas, el anticuerpo adsorbido se puede retirar (eluir) del ligando y el soporte, dando como resultado el aislamiento del anticuerpo de la composición original. Los métodos de retirada del anticuerpo del ligando y el soporte dependen del ligando y son conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cambios en el entorno, por ejemplo, en el pH, adición de agentes caotrópicos o desnaturalizantes, o la adición de tampones de elución disponibles en el mercado. En algunas realizaciones, se puede emplear más de un procedimiento de purificación en una composición de anticuerpo. Se conocen distintos ligandos de afinidad. Dos de los más conocidos son la Proteína A y la Proteína G (y combinaciones de las mismas). Los ligandos inmovilizados están disponibles en el mercado. Por ejemplo, los sistemas de afinidad de proteína incluyen MabSelect, MabSelect SuRe, MabSelect Xtra, MabSelect SuRe LX, Sepharose CL-4B, ProSep vA, ProSep vA Ultra, ProSep vA UltraPlus, y Ceramic HyperD.

En general, la etapa de captura de la presente invención utiliza una cromatografía de afinidad a Proteína A y específicamente utiliza MabSelect SuRe, ProSep vA Ultra, o Poros MabSelect. MabSelect y MabSelect SuRe utilizan ambas una matriz de agarosa latamente reticulada. MabSelect SuRe se ha desarrollado para aguantar fuertes condiciones alcalinas, habitualmente se utilizan en el aclaramiento de la columna. La modificación de resina de Proteína A evita la interacción no deseada con los dominios variables del anticuerpo. ProSep vA Ultra es una resina basada en perlas porosas de vidrio. Combina una alta capacidad de unión con un alto rendimiento, pero también puede tener desventajas tales como un alto goteo de proteína A y la necesidad de agentes de limpieza especiales. Normalmente la realización más preferida de la captura por afinidad comprende la MabSelect SuRe.

La cromatografía de intercambio de iones incluye la cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y la cromatografía de intercambio aniónico (AEX). La AEX se describió anteriormente. La CEX es similar y se describe posteriormente. La cromatografía de intercambio catiónico se refiere a cualquier método por el que un anticuerpo y alguna impureza o impurezas se puede separar basándose en las diferencias de carga utilizando una matriz de intercambio catiónico. Una matriz de intercambio catiónico generalmente comprende grupos cargados negativamente unidos covalentemente. Se pueden emplear resinas de intercambio catiónico fuertes y débiles. Comúnmente, las resinas de

intercambio catiónico fuertes comprenden grupos orgánicos soportados que comprenden grupos de ácido sulfónico o sulfonatos, dependiendo del pH. Las resinas de intercambio catiónico débiles comúnmente comprenden grupos orgánicos soportados que comprenden ácido carboxílico o carboxilatos, dependiendo del pH. En ciertas realizaciones. Se pueden utilizar resinas de intercambio catiónico multimodal, que incorporan mecanismos de unión  
 5 adicionales, así como las interacciones iónicas, por ejemplo, una o más interacciones de uniones de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Ejemplos de resinas de intercambio catiónico adecuadas se conocen bien en la técnica, y pueden incluir, pero no se limitan a matriz de Fractogel, carboximetil (CM), sulfoetil (SE), sulfopropil (SP), fosfato (P), y sulfonato (S), PROP AC WCX-10TM (Dionex), Capto S, S-Sepharose FF, Fractogel EMD S03M, Toyopearl Megacap II SP 550C, Poros 50 HS, y SP-sepharose. En realizaciones preferidas, la resina catiónica se selecciona  
 10 de entre Capto S, S-Sepharose FF, Fractogel EMD S03M, Toyopearl Megacap II SP 550C, Poros 50 HS, más preferentemente Poros 50 HS. En algunas realizaciones, se pueden emplear más de un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico en la composición.

El procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico se puede emplear en modo unión o en modo de flujo  
 15 directo con respecto al anticuerpo, como se conoce bien en la técnica. En modo unión., el anticuerpo de interés se adsorbe en la matriz de intercambio catiónico, mientras que una o más impurezas no se unen, por lo tanto, se separa el anticuerpo de las impurezas. En algunas realizaciones, la matriz de intercambio catiónico se lava una o más veces con un tampón para retirar las impurezas adicionales antes de que se retire el anticuerpo adsorbido de la matriz de intercambio catiónico. Después de retirar una o más impurezas de una composición utilizando la  
 20 cromatografía de intercambio catiónico en modo unión, el anticuerpo adsorbido se puede retirar (eluir) de la matriz de intercambio catiónico. Por el contrario, el modo de flujo directo significa que el anticuerpo de interés no se adsorbe significativamente a la matriz de intercambio catiónico, mientras que una o más impurezas se adsorben (o están impedidos) en la matriz. El anticuerpo fluye a través de la columna mientras que las impurezas se unen, causando de esta manera una separación de las impurezas del anticuerpo. Periódicamente la matriz necesitará rejuvenecerse retirando las impurezas unidas o sustituyéndose con nuevo material de matriz.  
 25

La composición de anticuerpo que resulta de la etapa de captura o la etapa de pulido se considera una composición de anticuerpo parcialmente purificada. Normalmente, la composición de anticuerpo parcialmente purificada se forma  
 30 sometiendo la composición de anticuerpo inicial a cromatografía de afinidad tal como Proteína A, CEX, o cromatografía de modo mixto como etapa de captura seguido por al menos una etapa de pulido. La etapa de pulido a menudo es una etapa de IEX y particularmente de CEX. En algunas realizaciones, la etapa de pulido comprende CEX y AEX en cualquier orden (es decir, una CEX seguida por AEX; AEX seguida por CEX). Una composición de anticuerpo parcialmente purificada, con o sin un tratamiento adicional, se somete normalmente a una UF/DF para formar una composición de anticuerpo purificada con UF/DF.  
 35

Además de las etapas de captura y pulido expuestas anteriormente, la composición de anticuerpo se somete  
 igualmente a una o más etapas de retirada de virus. Un virus se "retira" cuando se inactiva o se retira físicamente de la composición (o ambos). En algunas realizaciones de la presente invención, se lleva a cabo una etapa de retirada del virus después del procedimiento de captura y antes del pulido y/o después del pulido y antes de la UF/DF.  
 40 Normalmente, se lleva a cabo una etapa de inactivación vírica después de la captura y antes del pulido. Una etapa de retirada física de virus se lleva a cabo normalmente después del pulido y antes de la UF/DF.

Cuando se hace referencia a la inactivación de virus, los virus pueden permanecer en el producto final, pero no en forma infecciosa. La etapa de inactivación vírica puede comprender una etapa de inactivación por pH y/o una etapa de inactivación química. La etapa de inactivación por pH puede incluir el ajuste del pH a un pH de aproximadamente  
 45 5,0 o menos, a menudo aproximadamente 4, 0 o menos y normalmente en el intervalo de 1,5 a aproximadamente 4,5, más normalmente aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0. La etapa de inactivación por pH puede incluir la incubación de la composición con uno o más valores de pH en el intervalo anterior durante distintas longitudes de tiempo suficientes para que se produzca la retirada del virus (por ejemplo, la inactivación vírica), por ejemplo, 1  
 50 minuto a 2 horas y normalmente 45 minutos a 75 minutos. La etapa de inactivación química puede incluir el tratamiento con disolventes o detergentes, radiación, y/o breves exposiciones a altas temperaturas suficientes para inactivar el virus. Estos métodos de inactivación vírica se conocen por los expertos en la técnica, y un experto en la técnica puede seleccionar una condición apropiada de tratamiento.

Cuando la etapa de retirada del virus comprende la retirada física del virus de la composición, normalmente está implicada una filtración. Específicamente, una nanofiltración que comprende pasar la composición a través de una  
 matriz que tiene un tamaño de poro de, por ejemplo, menos de 75 nm tal como menos de 50 nm e incluso menos de 15 nm, para separar los virus del anticuerpo. Están disponibles distintos nanofiltros en el mercado y se conocen en la técnica.  
 60

La composición de anticuerpo parcialmente purificada, con o sin las etapas de retirada de virus, se puede someter a UF/DF para formar una composición de anticuerpo purificada por UF/DF. La UF/DF es una operación combinada de ultrafiltración y diafiltración. La etapa de retirar partículas concentra el anticuerpo, e intercambia/modifica la  
 composición acuosa o tampón de la composición de anticuerpo. Aunque se conoce bien en la técnica, por claridad el  
 65 término "ultrafiltración" se refiere al procedimiento de separación de impurezas del anticuerpo pasando la composición a través de uno o más filtros semi-permeables (o membrana o medio) con un diámetro de tamaño de

poro específico, en el que las moléculas más grandes (generalmente > 103-106 Da) se retienen en el filtro, mientras que el agua y las moléculas de menor peso molecular pasa a través del filtro. Estas moléculas de menor peso molecular pueden ser componentes del medio, fragmentos de anticuerpo, y/u otros contaminantes (impurezas) tales como, por ejemplo, lipopolisacáridos. Normalmente, el anticuerpo de la presente invención está sustancialmente en la corriente de retenido, mientras que las impurezas están sustancialmente en la corriente de permeado. La expresión "corriente de permeado" cuando se hace referencia a filtración se refiere a la fracción de la composición que pasa a través de los poros del filtro durante la filtración. La expresión "corriente de retenido" cuando se hace referencia a filtración se refiere a la fracción de la composición que permanece en el filtro o que no pasa a través de los poros del filtro durante la filtración. Este proceso también concentra la composición de anticuerpo.

Los tipos de aparatos UF/DF adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden seleccionar basándose en distintos factores, por ejemplo, el peso molecular del anticuerpo que se va a filtrar, la cantidad y tamaño de los componentes de la composición que se va a filtrar, el volumen de la composición que se va a filtrar, y la densidad y viabilidad celular de la composición que se va a filtrar. En algunas realizaciones, se pueden utilizar filtros tal como ultrafiltros de membrana, ultrafiltros de placa, ultrafiltros de cartucho, ultrafiltros de bolsa, o ultrafiltros al vacío. Los ultrafiltros disponibles en el mercado que se pueden emplear se fabrican por distintos vendedores tales como Millipore Corporation (Billerica, Mass.), Pall Corporation (East Hills, N.Y.), GE Healthcare Sciences (Piscataway, N.J.), y Sartorius Corporation (Goettingen, Alemania).

La diafiltración sirve para preparar la composición de anticuerpo para su uso final, tal como el almacenamiento, liofilización, formulación parenteral, etc. El sistema también se intercambia normalmente y/o se modifica añadiendo/retirando/sustituyendo los agentes tampón y/o su concentración. Los aditivos adicionales se pueden introducir, por ejemplo, para ajustar el pH, tonicidad, solubilidad, y/o estabilidad. La estabilidad puede referirse a la estabilización de la composición de anticuerpo en estado líquido o para proteger el anticuerpo durante la liofilización o reconstitución. Por ejemplo, en una composición de trastuzumab, se puede añadir trealosa como estabilizante.

Si el uso final de la composición de anticuerpo es una formulación parenteral, es posible añadir algunos o todos los excipientes de formulación deseados mediante la etapa de diafiltración. Estos excipientes pueden incluir tampón fosfato (por ejemplo, soluciones de fosfato sódico), solución salina (por ejemplo, al 0,8 %), dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer, electrolitos, tensioactivos (polisorbato), estabilizantes, y conservantes tales como antimicrobianos o antioxidantes.

La diafiltración no necesita colocar la composición en una forma farmacéutica final ni proporcionar cada excipiente. Los excipientes adicionales o el cambio completo de la composición se pueden llevar a cabo después de la UF/DF o a etapa de tratamiento con AEX posterior. No obstante, la etapa de UF/DF generalmente coloca la composición de anticuerpo en una forma farmacéutica casi final y por lo tanto se pueden introducir uno o más de los aditivos anteriores durante la UF/DF en la composición de anticuerpo purificada por UF/DF.

La composición de anticuerpo purificada por UF/DF se somete a una AEX como se ha descrito anteriormente para reducir una o más impurezas tal como las HCP y formar una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura. Por razones de eficacia, el tratamiento con AEX habitualmente sigue directamente la etapa de UF/DF. Es posible, sin embargo, que se produzcan etapas de intervención. Dichas etapas podrían incluir una etapa de UF adicional o una etapa de retirada de virus. En realizaciones preferidas, no se intercala otras etapas de purificación cromatográfica entre la etapa de UF/DF y la etapa de AEX. Esta preferencia no excluye múltiples etapas de AEX.

Después de la etapa de AEX de la presente invención, la composición de anticuerpo puede modificarse adicionalmente para su uso final. Aunque son posibles etapas adicionales después de la etapa de AEX, normalmente no se lleva a cabo ninguna etapa adicional de purificación cromatográfica. Las etapas de retirada de virus se pueden llevar a cabo, así como una modificación de la composición. Antes de la carga en volumen o los viales, se puede llevar a cabo cualquiera de las siguientes etapas: (a) añadir un excipiente a dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; (b) concentrar dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; (c) diluir dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; (d) ajustar el pH de dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; y/o (e) esterilizar por filtración dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura. Con o sin etapas adicionales, la composición de anticuerpo puede prepararse para la carga en volumen o para dispensarla en viales como una formulación parenteral. De manera alternativa, la composición puede liofilizarse para el almacenamiento y la reconstitución posterior.

En realizaciones, la composición de anticuerpo farmacéuticamente pura que se han sometido a AEX de acuerdo con la presente invención tiene una concentración de anticuerpo de 5 a 150 mg/ml, tal como 15 a 50 mg/ml y 20-25 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas que contiene el anticuerpo producidas por el método de la invención puede comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tal como seroalbúmina humana, sustancias tampón tal como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales, agua, sales o electrolitos, tal como sulfato de protamina, fosfato hidrógeno disódico, fosfato hidrógeno potásico, cloruro

sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato magnésico, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, polímeros bloque de polietileno-polioxipropileno, y polietilenglicol. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tampón. Las formulaciones parenterales pueden ser en una dosis de embolada única, en infusión o una dosis de embolada de carga seguido con una dosis de mantenimiento.

10 Cuando se aíslan anticuerpos, en algunas realizaciones pueden estar presentes grandes volúmenes de una composición, por ejemplo, durante los procedimientos de fabricación comercial. Los cultivos celulares que expresan los anticuerpos que se van a aislar pueden cultivarse en un recipiente de tamaño apropiado para la fabricación a gran escala tal como un biorreactor. Los grandes volúmenes presentan serios desafíos para los procedimientos de aislamiento. Por ejemplo, el efecto que un pequeño cambio en el flujo a través de un filtro tiene sobre la recuperación de un anticuerpo aislado se amplifica cuando se utilizan grandes volúmenes. Al igual, cuando se utilizan grandes volúmenes, el efecto que un aumento en la densidad celular en la composición original tiene sobre la recuperación del producto también se amplifica. Por lo tanto, el uso de grandes volúmenes de una composición presenta problemas únicos que se amplifican y tienen mayores ramificaciones con respecto al uso de volúmenes menores. En consecuencia, en algunas realizaciones la presente invención se refiere a un método de aislamiento de anticuerpo presente en un gran volumen de una composición. La expresión "gran volumen" se refiere a volúmenes asociados con la producción comercial y/o industrial de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la expresión "gran volumen" se refiere a 10 a 2.000 litros, 20 a 1.000 litros o 50 a 500 litros. En algunas realizaciones, la expresión "gran volumen" se refiere a al menos 500 litros, al menos 750 litros, al menos 1.000 litros, al menos 1.250 litros, al menos 1.500 litros, al menos 2.000 litros, al menos 5.000 litros o al menos 10.000 litros.

25 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo producido por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo o composición que comprende el anticuerpo producido por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento es farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un anticuerpo o composición que es, en el ámbito del sano juicio médico, adecuado para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad u otras complicaciones acordes con una relación riesgo/beneficio razonable.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado por los métodos de la presente invención se puede utilizar en el tratamiento de un sujeto. Como se utiliza en el presente documento, "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos y no humanos, tal como, pero sin limitarse a, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, animales deportivos y mascotas. En algunas realizaciones, sujeto se refiere a un ser humano.

40 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y profiláctico, mantenimiento o medidas preventivas, en los que el objetivo es prevenir o aliviar (disminuir) una afección fisiológica, trastorno, o enfermedad no deseada, o para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados.

45 La vía de administración del producto de anticuerpo aislado del método de la presente invención puede ser, por ejemplo, vía oral, parenteral, por inhalación, o modos tópicos de administración.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

## 50 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Purificación convencional

55 El siguiente procedimiento se utiliza para la purificación en cuatro ejecuciones. Una composición que comprende trastuzumab producido por células CHO se sometió a captura en una columna de Proteína A, inactivación vírica, pulido utilizando AEX seguida por CEX, filtración vírica, y entonces se sometió a UF/DF. Las etapas se llevaron a cabo de la siguiente manera:

60 La etapa de Proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare) comenzaba con la esterilización de una columna con 0,1 M de NaOH durante 15 minutos, seguido por un aclarado con agua purificada Mili Q (MQ). La columna se equilibró entonces con PBS a pH 7,4. La recolección se cargó en la columna con una relación de < 25 mg de trastuzumab por ml de MabSelectSure. La columna se lavó entonces con tampón de equilibrado, seguido por un lavado con 25 mM de NaAc pH 5,0. El anticuerpo se eluyó entonces con 25 mM de Acetato pH 3,0.

A continuación, la inactivación vírica. El pH del agrupamiento de elución de la Proteína A se llevó a un pH de 3,5 con 0,1 M de HCl y se mantuvo a este pH durante 60-75 minutos. El pH se elevó de nuevo a pH 4,5 con 0,1 M de NaOH, seguido por esterilización por filtración con un filtro de 0,22 µm.

5 A continuación, la cromatografía de intercambio aniónico. Se pre-enjuagó una membrana de intercambio aniónico (Mustang Q filter, Pall) con MQ, seguido por una esterilización con 1,0 M de NaOH con 5 volúmenes de membrana (MV). Tras la neutralización con 25 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 1 M de NaCl, se equilibró el filtro con 25 mM de NaAc + 10 mM de NaCl a un pH de 4,5. El filtro se cargó como máximo con ≤ 3,0 g (ml MV)<sup>-1</sup> de anticuerpo de la etapa de inactivación vírica anterior. El anticuerpo se hizo fluir a través del filtro mientras que los contaminantes tales como las proteínas de CHO residuales y el ADN se unían al filtro. El filtro se aclaró con 25 mM de NaAc + 10 mM de NaCl  
10 pH 4,5 y el producto eluido se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

A continuación, la cromatografía de intercambio catiónico. Se esterilizó la columna de cromatografía de intercambio catiónico (columna Poros HS50; Applied Biosystems) con 0,5 M de NaOH y se aclaró con MQ. Se hizo el equilibrado  
15 con 25 mM de NaAc pH 4,5 + 10 mM de NaCl. El volumen de anticuerpo purificado por el procesamiento cromatográfico de intercambio aniónico se cargó con una concentración de 10-20 g de anticuerpo /ml de resina. Entonces se lavó la columna con el tampón de equilibrado, seguido por un lavado con 25 mM de NaAc pH 4,5 + 200 mM de NaCl. El producto de anticuerpo se eluyó entonces utilizando un gradiente desde 25 mM de NaAc pH 4,5 + 200 mM de NaCl a 25 mM de NaAc pH 4,5 + 290 mM de NaCl en tres volúmenes de columna. La elución continuó  
20 con 25 mM NaAc pH 4,5 + 290 mM de NaCl.

A continuación, la filtración vírica. El producto de anticuerpo de la cromatografía de intercambio catiónico se filtró de virus utilizando la membrana Viresolve Pro (Millipore) utilizando un sistema de filtración a presión, de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. El dispositivo Viresolve Pro se pre-enjuagó con MQ y se equilibró con 25 mM  
25 de NaAc + 290 mM de NaCl pH 4,5. Después de la aplicación del volumen de la CEX con una carga de < 565 g m<sup>-2</sup> (Planova), < 2 kg m<sup>-2</sup> (Viresolve Pro) el filtro se enjuagó con 25 mM de NaAc + 290 mM de NaCl pH 4,5. Después de parar la filtración, el producto de anticuerpo se filtró de virus utilizando un filtro de 0,22 µm.

La ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) se llevó a cabo utilizando un filtro Biomax 50 KD (ejecución 1) o 30 kg (ejecución 2-4) UFDF (Millipore) con un corte de peso molecular de 30 kDa. El filtro se pre-enjuagó con MQ, se esterilizó con 0,1 M de NaOH, seguido por un aclarado con MQ para retirar el NaOH. El filtro se equilibró entonces  
30 con 25 mM de Acetato pH 4,5 + 290 mM de NaCl. El producto de anticuerpo filtrado de virus se cargó posteriormente en el filtro utilizando una carga de <730 g de anticuerpo/m<sup>2</sup> de membrana. Después de la concentración a 25-35 mg/ml, el tampón del producto de anticuerpo se intercambió a 50 mM de trealosa + 4,3 mM de Histidina pH 6,0. Se utilizaron 10 volúmenes de diafiltración para intercambiar el tampón.  
35

El producto final de cada ejecución se ensayó en cuanto al contenido, impurezas relacionadas con el producto (dímeros, agregados), e impurezas relacionadas con el procesamiento (HCP, resProtA, resADN). Un resumen de los resultados está en la Tabla 1 (LOQ significa el límite de cuantificación).  
40

Tabla 1: Un resumen de los resultados obtenidos de las 4 ejecuciones

Ejecución	Contenido de Trastuzumab (mg / ml)	Dímeros/ Agregados (%)	HCP <sup>1</sup> ppm	HCP <sup>2</sup> ppm	res Prot A ppm
Ejecución 1	20,3	0,34/0	3,3	43,7	<LOQ
Ejecución 2	19,9	0,15/0	4,2	80,8	2,0
Ejecución 3	19,9	0,37/0	7,4	62,9	<LOQ
Ejecución 4	19,5	0,25 / 0	6,0	24,3	<LOQ

<sup>1</sup> Para estos valores se utilizó el kit F015 CHO (Cygnus).  
<sup>2</sup> Para estos valores se utilizó el kit F550 CHO (Cygnus).

Los inventores señalan que, utilizando el kit antiguo, el kit F015 CHO (Cygnus), los valores de proteína de célula huésped (HCP) parecían ser menores de 10 ppm. Sin embargo, cuando el ensayo se repitió utilizando el nuevo kit  
45 F550 CHO (Cygnus) más sensible, se descubrió que las proteínas de la célula huésped estaban actualmente presentes a un nivel inadecuadamente más alto de lo que se señaló anteriormente. Los inventores deseaban disminuir los niveles de HCP a menos de 10 ppm.

Para las impurezas relacionadas con el producto (como dímeros, agregados de FTMB), las cuatro muestras tenían niveles adecuadamente bajos de impurezas relacionadas con el producto (Tabla 1). Todas las impurezas relacionadas con el producto o el procesamiento (excepto las proteínas de CHO) se retiraron hasta los niveles de umbral deseado.

5

## Ejemplo 2

### Purificación con un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico después del procedimiento de ultrafiltración final

10

Se purificó una composición que comprende trastuzumab producido por células CHO como se ha descrito en el Ejemplo 1, con las siguientes diferencias. Para la ejecución 5, la etapa de la Proteína A se modificó para incluir un lavado con 1 M de cloruro sódico, se eliminó la etapa de filtración de virus, la etapa de UF/DF utilizaba un dispositivo vivaspin, y se utilizaron 1000 volúmenes de diafiltración para intercambiar el tampón. Para la ejecución 6, la etapa de la Proteína A se modificó para incluir un lavado con 1 M de cloruro sódico, la etapa de filtración de virus utilizaba un filtro 15N de Plenova (Asahi Kasei), y la etapa de UF/DF utilizaba un filtro Ultracel de 30 KD. Adicionalmente, se eliminó la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) pre-UF/DF y la siguiente etapa de AEX se añadió después de la etapa de UF/DF.

15

20

AEX sobre el material concentrado y diafiltrado: Para la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó un filtro Mustang Q (Pall). La membrana se pre-enjuagó con MQ que continuaba con una esterilización con 1,0 M de NaOH con 5 volúmenes de membrana (MV). Después de la neutralización con 25 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 1 M de NaCl seguido por un enjuague con MQ, el filtro se equilibró con 50 mM de trealosa + 4,2 mM de histidina pH 6,0. Para la ejecución 5, el filtro se cargó con 0,36 g de trastuzumab (ml MV)<sup>-1</sup>; para la ejecución 6, el filtro se cargó como máximo con ≤ 3,0 g de trastuzumab (ml MV)<sup>-1</sup>. El anticuerpo se hizo fluir a través del filtro mientras los contaminantes como las proteínas residuales de CHO y el ADN se unen al filtro. El filtro se enjuagó con 50 mM de trealosa + 4,2 mM de histidina pH 6,0 y el flujo recolectado se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

25

30

Las muestras finales de las dos ejecuciones separadas se ensayaron en cuanto al contenido, impurezas relacionadas con el producto (dímeros, agregados), e impurezas relacionadas con el procesamiento (HCP, resProtA, resADN). Un resumen de estos resultados se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 2: Un resumen de los resultados obtenidos de 2 ejecuciones

Ejecución	Contenido de Trastuzumab (mg / ml)	Dímeros/Agregados (%)	HCP <sup>1</sup> ppm	res Prot A ppm	ADN ppb
5	7,90	0,5/0	<1	n/d	<10
6	23,4	nd	<0,65	<0,04	<0,07

<sup>1</sup>: Para estos valores se utilizó el kit F550 CHO (Cygnus)  
nd: no determinado

35

Los niveles de proteínas de célula huésped estaban por debajo de los niveles de HCP deseados (menos de 10 ppm) utilizando el nuevo kit F550 CHO (Cygnus) más sensible para la detección. Ambas muestras habían tenido niveles adecuadamente bajos de impurezas relacionadas con el procesamiento y el producto (por ejemplo, dímeros, agregados de trastuzumab). Este resultado demuestra que la pureza total está mejorada utilizando el mismo número de etapas resituando la etapa de la AEX después de la etapa final de UF/DF.

40

## Ejemplo 3

### Purificación con un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico antes y después del procedimiento final de ultrafiltración

45

Una composición que comprendía trastuzumab producido por células CHO se purificó como se describe en el Ejemplo 1, con las siguientes diferencias. Para las ejecuciones 7-10, la etapa de filtración de virus utilizaba un filtro 15 N Plenova (Asahi Kasei), y la etapa de UF/DF utilizaba un filtro Ultracel de 30 KD. Adicionalmente, se llevó a cabo una etapa AEX después de la etapa de UF/DF, y se llevó a cabo una etapa de AEX adicional como se ha descrito para la ejecución 2 del Ejemplo 2.

50

Las muestras finales de las cuatro ejecuciones separadas se ensayaron en cuanto al contenido, impurezas relacionadas con el producto (dímeros, agregados), e impurezas relacionadas con el procesamiento (HCP, res Prot A, resADN). Un resumen de los resultados está en la Tabla 3.

55

Tabla 3: Un sumario de los resultados obtenidos de 4 ejecuciones

Ejecución	Contenido de Trastuzumab (mg / ml)	Dímeros/Agregados (%)	HCP <sup>2</sup> ppm	res Prot A ppm	ADN ppb
7	23,3	0,31/0,03	7,47	<0,3	nd
8	21	monómeros: 99,4	<0,47	<0,83	<1,0
9	24	monómeros: 99,5	<0,50	<0,81	<1,0
10	23	monómeros: 97,4	<1,4	<0,88	<1,0

<sup>2</sup> Para estos valores se utilizó el kit F550 CHO (Cygnus).  
nd: no determinado.

5 Los niveles de proteínas de células huésped (del proceso que tenía dos procedimientos de cromatografía de intercambio aniónico: uno antes y otro después de la etapa de UF/DF) estaban por debajo de los niveles de HCP deseados (menos de 10 ppm) utilizando el nuevo kit F550 CHO (Cygnus) para la detección de las cuatro ejecuciones que se ensayaron. Las impurezas relacionadas con el procesamiento y el producto eran también adecuadamente bajas.

10 Estos ejemplos demuestran que se puede conseguir un aumento de la pureza de los anticuerpos (por ejemplo, la disminución de la concentración de proteínas de célula huésped) llevando a cabo un procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico después del procedimiento final de UF/DF.

**Conclusión**

15 Todas las distintas realizaciones u opciones descritas en el presente documento se pueden combinar en cada una de las variaciones. Aunque la invención se ha demostrado y descrito particularmente en referencia a algunas realizaciones de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se han presentado solo a modo de ejemplo, y sin limitación, y se pueden hacer distintos cambios en la forma y detalles.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de una composición de anticuerpo, que comprende someter una composición de anticuerpo purificada por ultrafiltración-diafiltración (UF/DF), en donde dicha composición de anticuerpo purificada por UF/DF tiene una concentración de anticuerpo de 5 a 250 mg/ml, tal como 10 a 150 mg/ml y 15 a 100 mg/ml, y el anticuerpo se produce en células eucariotas, a una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para formar una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura, en donde dicha AEX es la última etapa de purificación cromatográfica y se lleva a cabo en un modo de flujo directo después de la etapa de UF/DF final, y en donde dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura tiene una concentración de proteína de célula huésped de 10 ppm o menos y una concentración de ADN de 20 ppb o menos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente cargar en viales dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente el filtrado aséptico de dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura antes de dicha etapa de carga.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende adicionalmente al menos una de las siguientes etapas antes de dicha etapa de carga: (a) añadir un excipiente a dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; (b) concentrar dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; (c) diluir dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura; y/o (d) ajustar el pH de dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente someter una composición de anticuerpo parcialmente purificada a una UF/DF para formar dicha composición de anticuerpo purificada con UF/DF.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente someter una recolección de anticuerpo del cultivo celular a una etapa de captura del anticuerpo y opcionalmente a al menos una etapa de pulido para formar dicha composición de anticuerpo parcialmente purificada.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha etapa de captura utiliza una cromatografía de afinidad, tal como una cromatografía con Proteína A.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha etapa de captura utiliza una cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC) o una cromatografía de modo mixto.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que al menos se lleva a cabo una etapa de pulido después de dicha etapa de captura.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha al menos una etapa de pulido se selecciona de entre el grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía con hidroxapatita.
11. Un método de purificación de una composición de anticuerpo, que comprende:  
someter una recolección de anticuerpo de un cultivo de célula eucariota a una cromatografía de afinidad, tal como una cromatografía con Proteína A, para formar una composición de anticuerpo en bruto;  
someter la composición de anticuerpo en bruto a al menos una etapa de pulido para formar una composición de anticuerpo parcialmente purificada;  
someter la composición de anticuerpo parcialmente purificada a una etapa de UF/DF para formar una composición de anticuerpo purificada por UF/DF; y  
someter la composición de anticuerpo purificada por UF/DF, en donde dicha composición de anticuerpo purificada por UF/DF tiene una concentración de anticuerpo de 5 a 250 mg/ml, tal como de 10 a 150 mg/ml y de 15 a 100 mg/ml, a una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para formar una composición de anticuerpo farmacéuticamente pura, en donde dicha AEX es la última etapa de purificación cromatográfica y se lleva a cabo en un modo de flujo directo después de la etapa final de UF/DF, y en donde dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura tiene una concentración de proteína de célula huésped de 10 ppm o menos y una concentración de ADN de 20 ppb o menos.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente someter dicha composición de anticuerpo farmacéuticamente pura a una etapa de retirada de virus tal como nanofiltración.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha al menos una etapa de pulido comprende someter dicha composición de anticuerpo en bruto a al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico

(IEX).

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho anticuerpo es trastuzumab o pertuzumab.