

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 354**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/021802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14722399 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2970379**

54 Título: **Métodos para aumentar la pureza de proteínas utilizando la cromatografía basada en proteína A**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783381 P

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

18.12.2019

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**BIAN, NANYING y
HOLSTEIN, MELISSA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 735 354 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

Métodos para aumentar la pureza de proteínas utilizando la cromatografía basada en proteína A

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona métodos para aumentar la pureza de una proteína que contiene Fc reduciendo el nivel de agregados de proteínas en una muestra utilizando una cromatografía basada en proteína A que emplea ligandos de proteína A basados en el dominio C de la proteína A.

Antecedentes de la invención

10 Los procesos convencionales para la purificación de proteínas típicamente involucran métodos de cultivo celular, por ejemplo, utilizando líneas celulares de mamíferos o bacterianas diseñadas de forma recombinante para producir la proteína de interés, seguido de: (a) una etapa de clarificación para la eliminación de células y desechos celulares, por ejemplo, usando centrifugación diferencial y/o filtración; y (b) una o más etapas de cromatografía posteriores para separar la proteína de interés de varias impurezas en la alimentación del cultivo celular clarificado.

15 Los agregados de proteínas o las especies de proteínas de alto peso molecular son una de las impurezas importantes que deben eliminarse de las preparaciones biofarmacéuticas que contienen un producto de interés, por ejemplo, una proteína que contiene Fc o una molécula de anticuerpo. Por ejemplo, los agregados de proteínas y otros contaminantes deben eliminarse de las preparaciones biofarmacéuticas que contienen un producto de interés antes de que el producto pueda usarse en aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas u otras. Esto es especialmente importante en el caso de las aplicaciones terapéuticas y para obtener la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos.

20 En el caso de los anticuerpos monoclonales y las proteínas que contienen Fc, el estándar de la industria para los procesos de purificación generalmente implica un proceso de purificación, que incluye varias etapas. Una de las etapas importantes es una etapa de purificación que emplea un ligando de afinidad llamado Proteína A, aislado de *Staphylococcus aureus*, y que se une a la región Fc de los anticuerpos. Normalmente, los agregados de proteínas también se unen a la columna de Proteína A y, a menudo, terminan en la misma mezcla de elución que la proteína que contiene Fc.

25 La eliminación de agregados de proteínas puede ser un desafío, ya que a menudo hay similitudes entre las propiedades físicas y químicas de los agregados de proteínas y el producto de interés en una preparación biofarmacéutica, que generalmente es una molécula monomérica. En el caso de las proteínas que contienen Fc, tras la cromatografía de la Proteína A, se pueden usar uno o más métodos posteriores para la eliminación de agregados de proteínas de las preparaciones biofarmacéuticas que incluyen, por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrófoba.

30 Anteriormente, se ha informado de que algunos de los agregados de proteínas se pueden eliminar durante la etapa de cromatografía de Proteína A utilizando una elución en gradiente de pH. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n° WO2011/028753 y Pan et al., *Analytical Biochemistry* 388 (2009) 273-278. Sin embargo, como se analiza en estas referencias, los agregados de proteínas se eluyen de la columna de Proteína A después de o con la elución de la proteína que contiene Fc.

Compendio de la invención

35 La presente invención proporciona métodos nuevos y mejorados para eliminar una mayor cantidad de agregados de proteínas de una muestra que contiene una proteína que contiene Fc respecto de los métodos descritos anteriormente. Los métodos descritos en la presente memoria emplean un ligando de Proteína A basado en el dominio C de la Proteína A que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 3 o la SEQ ID N°: 4 y utiliza una elución en gradiente de pH o una elución por etapas de pH, lo que da como resultado la elución de al menos el 30% de los agregados de proteínas antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de la eliminación de agregados de proteínas después de la elución de la proteína que contiene Fc. En consecuencia, los métodos descritos en la presente memoria dan como resultado una mayor eliminación total de los agregados de proteínas respecto de los métodos descritos en la técnica anterior, que eliminan principalmente los agregados de proteínas después de la elución de la proteína que contiene Fc.

40 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento nuevo e inesperado de que mediante la unión de una proteína que contiene Fc a un ligando de proteína A inmovilizado basado en el dominio C de la proteína A, y eluyendo utilizando un método de gradiente de pH o un método de etapas de pH, como se describe en la presente memoria, al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de la eliminación de los agregados de proteínas después de la elución de la proteína que contiene Fc. La eliminación de una mayor cantidad de agregados de proteínas que los métodos de la técnica anterior no solo da como resultado un aumento de la pureza de la proteína que contiene Fc en la mezcla de elución, sino que también reduce la carga de una o más etapas posteriores que pueden usarse para eliminar tales agregados de proteínas. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria reducen el número de etapas posteriores para eliminar los agregados de proteínas, o evitan la necesidad de usar una o más etapas posteriores para eliminar los agregados

de proteínas de la mezcla de elución después de la etapa de Proteína A.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir el nivel de agregados de proteínas en una mezcla de elución que contiene una proteína que contiene Fc, y el método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende una proteína que contiene Fc y agregados de proteínas; poner en contacto la muestra con un ligando de proteína A inmovilizado sobre un soporte sólido, en donde el ligando de proteína A se basa en el dominio C de la proteína A, de modo que la proteína que contiene la región Fc se une al ligando de proteína A; obtener un grupo de elución que contiene la proteína que contiene Fc utilizando un método de gradiente de pH que emplea un tampón de pH alto y un tampón de pH bajo; en donde al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de los agregados de proteínas que se eliminan después de la elución de la proteína que contiene Fc, reduciendo así el nivel de agregados de proteínas en la mezcla de elución.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir el nivel de agregados de proteínas en una mezcla de elución que contiene una proteína que contiene Fc, y el método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende una proteína que contiene Fc y agregados de proteínas; poner en contacto la muestra con un ligando de proteína A inmovilizado sobre un soporte sólido, en donde el ligando de proteína A se basa en el dominio C de la proteína A, de modo que la proteína que contiene la región Fc se une al ligando de proteína A; obtener una mezcla de elución que contiene la proteína que contiene Fc utilizando un método de etapas de pH que emplea dos o más tampones utilizados secuencialmente por orden de valores de pH descendentes, en donde al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de los agregados de proteínas que se eliminan después de la elución de la proteína que contiene Fc, lo que reduce el nivel de agregados de proteínas en la mezcla de elución.

20 En algunas realizaciones, se obtiene una mezcla de elución utilizando un método de etapas de pH que emplea una serie de etapas de cambios pequeños de pH, en orden descendente de valores de pH. En algunas realizaciones, cada cambio pequeño de pH es del orden de 0,1 a 0,5. En una realización particular, cada cambio pequeño de pH es del orden de 0,2.

25 En algunas realizaciones, la serie de etapas de cambios pequeños de pH incluye dos o más etapas, o tres o más etapas, o cuatro o más etapas, o cinco o más etapas, o seis o más etapas, o siete o más etapas, u ocho o más etapas, o nueve o más etapas, o diez o más etapas. En una realización particular, la serie de etapas de cambios de pH que se utilizan son del orden de: pH 5,0; pH 4,8; pH 4,6; pH 4,4; pH 4,2; pH 4,0; pH 3,8; pH 3,6; pH 3,4; pH 3,2; y pH 3,0.

30 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para aumentar la pureza de una proteína que contiene Fc, y el método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende una proteína que contiene Fc y agregados de proteínas; poner en contacto la muestra con un ligando de Proteína A inmovilizado sobre un soporte sólido, en donde el ligando de Proteína A se basa en el dominio C de la Proteína A, y en donde la proteína que contiene Fc se une al ligando de Proteína A; y obtener una mezcla de elución que contiene la proteína que contiene Fc utilizando un método de elución en gradiente de pH o un método de etapas de pH, en donde al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de los agregados de proteínas que se eliminan después de la elución de la proteína que contiene Fc, lo que aumenta la pureza de la proteína que contiene Fc en la mezcla de elución.

35 En algunas realizaciones, la proteína A comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 3. En otras realizaciones, la proteína A comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 4.

40 En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, en el caso del método de elución en gradiente de pH, un tampón de pH alto tiene un pH de aproximadamente 6,0, y el tampón de pH bajo tiene un pH de aproximadamente 3,0.

45 En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, en el caso del método de elución por etapas de pH, al menos uno de los tampones utilizados tiene un pH que varía de 3,6 a 4,4.

50 En algunas realizaciones, los métodos de elución por etapas descritos en la presente memoria emplean una serie de etapas de cambios pequeños de pH, donde las etapas de pH varían desde un pH alto de aproximadamente 5,0 a un pH bajo de aproximadamente 3,0, y cada etapa de pH difiere de la etapa de pH anterior en un pH de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5. En una realización particular, se utilizan etapas de cambio de pH pequeños en el orden de: 5,0; 4,8; 4,6; 4,4; 4,2; 4,0; 3,8; 3,6; 3,4; 3,2; y 3,0.

55 En algunas realizaciones, la proteína que contiene Fc es un anticuerpo o una proteína de fusión con Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, en el caso de la elución en gradiente de pH, el gradiente de pH abarca de 5 volúmenes de columna a 30 volúmenes de columna.

Los ejemplos de soportes sólidos utilizados para la inmovilización de la proteína A incluyen, entre otros, vidrio de poro controlado, sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, agarosa, polimetacrilato, poli(acrilamida), poli(éter vinílico),

poli(alcohol vinílico) y poliestireno y derivados de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1A muestra la región de elución de los cromatogramas para mAb-1 (densidad de carga 12 mg/ml) con elución en gradiente de pH de tres resinas (A-MabSelect Sure™; B-Resina A y C-Resina C), donde el eje X representa los volúmenes de columna (VC), el eje Y izquierdo es la absorbancia UV a 280 nm (mAU, línea continua) y el eje Y derecho es el porcentaje de especies agregadas en cada fracción según lo determinado por SEC (cuadrados conectados). La cantidad de agregados de proteínas eliminados en el pre-pico para la Resina A y la Resina B son significativamente más altos que los de MabSelect SuRe™, lo que indica una eliminación de especies de agregados más eficiente al inicio del perfil. Para las tres resinas, también se obtiene una gran población de especies agregadas en las fracciones al final del perfil de elución, como también se informó anteriormente para MabSelect Sure™.

10 La Figura 1B muestra el rendimiento frente a la pureza del monómero para mAb-1 (densidad de carga 12 mg/ml) usando la elución en gradiente de pH de MabSelect SuRe™ (mostrado mediante rombos), Resina A (mostrado mediante cuadrados) y Resina B (mostrado mediante triángulos). La Resina A y la Resina B alcanzan niveles más altos de pureza de monómeros que MabSelect SuRe™ a la vez que mantienen altos rendimientos.

15 La Figura 2 muestra los perfiles SEC representativos obtenidos para las fracciones de elución de MabSelect SuRe™ y Resina A. El eje X representa el tiempo y el eje Y es la absorbancia UV a 280 nm. Se muestra el perfil de alimentación (mostrado con una línea negra continua), así como una fracción de la parte temprana del perfil de elución (pre-pico, mostrado con una línea discontinua gris), la mitad del perfil de elución (mostrado con una línea discontinua negra), y la parte tardía del pico de elución (post-pico, que se muestra con una línea de puntos). Los picos se normalizan y se alinean en función del pico de monómero (8-9 minutos). Para MabSelect SuRe™, se observa una mayor cantidad de eliminación de agregados en las fracciones que eluyen hacia el final del perfil. Para la Resina A, se observa una mayor cantidad de eliminación de agregados en las fracciones pre-pico y post-pico.

25 La Figura 3 muestra la región de elución de los cromatogramas para mAb-2 (densidad de carga 12 mg/ml) con una elución en gradiente de pH de cinco resinas (A-MabSelect Sure™; B-ProSep® Ultra Plus; C-Resina A; D-Resina B y E-Resina C), donde el eje X representa los volúmenes de columna (VC), el eje Y izquierdo es la absorbancia UV a 280 nm (medida en mAU y mostrada mediante una línea continua), y el eje Y derecho es el porcentaje de especies agregadas en cada fracción según lo determinado por SEC (mostrado mediante cuadrados conectados). La cantidad de agregados eliminados en el pre-pico de la Resina A y la Resina B es significativamente mayor que la de MabSelect SuRe™, ProSep® Ultra Plus o Resina C.

30 La Figura 4 muestra la región de elución de los cromatogramas para mAb-2 (densidad de carga 40 mg/ml) con elución en gradiente de pH de tres resinas (A-MabSelect Sure™; B-Resina A y C-Resina C), donde el eje X representa los volúmenes de columna (VC), el eje Y izquierdo es la absorbancia UV a 280 nm (medida en mAU y mostrada mediante una línea continua), y el eje Y derecho es el porcentaje de especies agregadas en cada fracción según lo determinado por SEC (mostrado mediante cuadrados conectados).

35 La Figura 5 muestra la región de elución de los cromatogramas para mAb-2 (densidad de carga 12 mg/mL) con elución por etapas de pH de tres resinas (A-MabSelect Sure™; B-Resina A y C-Resina C), donde el eje X representa los volúmenes de columna (VC), el eje Y izquierdo es la absorbancia UV a 280 nm (medida en mAU y mostrada mediante una línea continua), y el eje Y derecho es el porcentaje de especies agregadas en cada fracción según lo determinado por SEC (mostrado mediante cuadrados conectados).

40 La Figura 6 muestra un cromatograma para mAb-3 que utiliza Resina A y emplea una serie de etapas de cambios pequeños de pH para la elución, y cada etapa de pH difiere de la etapa de pH anterior en un valor de 0,2. La Figura 6a muestra un cromatograma para la elución de mAb-3 usando una serie de etapas de cambios pequeños de pH, donde el eje X representa los volúmenes de columna (VC), el eje Y izquierdo es la absorbancia UV a 280 nm (medida en mAU) y el eje Y derecho es el pH, donde las etapas de cambios pequeños de pH son: pH 5,0; pH 4,8; pH 4,6; pH 4,4; pH 4,2; pH 4,0; pH 3,8; pH 3,6; pH 3,4; pH 3,2 y pH 3,0. La Figura 6b muestra una versión ampliada del pico de elución principal del cromatograma de la Figura 6a, que muestra el porcentaje de especies agregadas presentes en cada fracción de elución por etapas.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención describe métodos para reducir el nivel de agregados de proteínas en una mezcla de elución que contiene una proteína que contiene Fc, de acuerdo con las reivindicaciones. La presente invención se basa, al menos, en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que, cuando se realiza la elución de la proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene Fc) de una columna de cromatografía de proteína A, utilizando una elución en gradiente de pH o una elución por etapas de pH, como se describe en la presente memoria, al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína objetivo, además de la eliminación de los agregados de proteínas después de la elución de la proteína objetivo, lo que conduce a una mayor pureza de la proteína objetivo en la mezcla de elución. Por consiguiente, en una realización de la invención, se proporciona un método para purificar una proteína objetivo, que comprende unir la proteína objetivo a un ligando de proteína A basado en el dominio C de la proteína A y eluir con un gradiente de pH. En otra realización de la invención, se proporciona un

método para purificar una proteína objetivo, que comprende unir la proteína objetivo a un ligando de Proteína A basado en el dominio C de la Proteína A y eluir con un método de etapas de pH.

Para que la presente descripción se entienda más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

5 I. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, el término "SpA", "Proteína A" o "Proteína A de *Staphylococcus aureus*" se refiere a una proteína multidominio de 42 kDa aislada de la bacteria *Staphylococcus aureus*. SpA está unida a la pared celular bacteriana a través de su región de unión a la pared celular carboxiterminal, conocida como dominio X. En la región amino-terminal, incluye cinco dominios de unión a inmunoglobulina, denominados E, D, A, B y C (Sjodhal, Eur J Biochem. Sep 78 (2): 471-90 (1977); Uhlen et al., J Biol Chem. Feb 259 (3): 1695-702 (1984)). Cada uno de estos dominios contiene aproximadamente 58 residuos de aminoácidos, y comparten un 65-90% de identidad de secuencia de aminoácidos.

Cada uno de los dominios E, D, A, B y C de SpA posee distintos sitios de unión a Ig. Un sitio es para Fc (la región constante de la clase IgG de Ig) y el otro es para la porción Fab de ciertas moléculas de Ig (la porción de la Ig que es responsable del reconocimiento de antígenos). Se ha informado que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La porción que no se une a Ig de SpA se encuentra en el extremo C y se denomina región X o dominio X.

Como se usa indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio C", "dominio C de SpA", "dominio C de la proteína A" y "dominio C de proteína A de *Staphylococcus aureus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en la SEQ ID N°: 1 o la codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID N°: 2. El "dominio C" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de los residuos de la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de los residuos de la superficie de las hélices 2 y 3. Un ligando de proteína A basado en el dominio C, como se describe en la presente memoria, incluye la secuencia del dominio C de tipo natural, así como cualquier variante y derivados de la misma, que se unen a una proteína que contiene Fc utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

En la invención reivindicada, un ligando de proteína A basado en el dominio C de la proteína A usado en los métodos descritos en la presente memoria comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 3 o SEQ ID N°: 4.

El término "cromatografía", como se usa en la presente memoria, se refiere a una técnica de separación dinámica que separa una proteína objetivo (por ejemplo, una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) de otras moléculas de la mezcla, y permite que se aisle. Típicamente, en un método de cromatografía, una fase móvil (líquido o gas) transporta una muestra que contiene la molécula objetivo de interés a través de un medio de fase estacionaria (normalmente sólido). Las diferencias en la partición o afinidad respecto de la fase estacionaria separan las diferentes moléculas, mientras que la fase móvil transporta las diferentes moléculas en un tiempo diferente.

El término "cromatografía de afinidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a un modo de cromatografía en el que una proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene Fc) a separar se aísla por su interacción con una molécula (por ejemplo, un ligando basado en proteína A) que interactúa específicamente con la proteína objetivo. En diversas realizaciones descritas en la presente memoria, la cromatografía de afinidad implica la adición de una muestra que contiene una molécula objetivo (por ejemplo, una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) a un soporte sólido que alberga un ligando basado en el dominio C de la proteína A.

El término "cromatografía de afinidad de proteína A", como se usa en la presente memoria, se refiere a la separación o el aislamiento de sustancias que utilizan proteína A o ligandos basados en SpA basados en el dominio C de la proteína A, como los descritos en la presente memoria, donde el ligando de SpA o de la proteína A está inmovilizado, por ejemplo, sobre un soporte sólido.

Los ejemplos de medios/resinas de cromatografía de afinidad de proteína A conocidos en la técnica incluyen aquellos que tienen la proteína A inmovilizada en un esqueleto de vidrio de poro controlado, por ejemplo, medios/resinas PROSEP® A y PROSEP® vA (EMD MILLIPORE); aquellos que tienen la proteína A inmovilizada en una fase sólida de poliestireno, por ejemplo, los medios/resinas POROS® 50A y POROS® MabCapture™ A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.); y aquellos que tienen la proteína A inmovilizada en un soporte sólido de agarosa, por ejemplo, rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o los medios o resinas MABSELECT™ (GE HEALTHCARE). Los ligandos de proteína A utilizados en los métodos descritos en la presente memoria pueden inmovilizarse sobre cualquiera de los soportes sólidos descritos anteriormente.

Además de las matrices mencionadas anteriormente, la proteína A también puede inmovilizarse sobre un polímero reticulado hidrófilo. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 7.951.885, que describe polímeros reticulados hidrófilos a modo de ejemplo. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se contempla que los ligandos abarcados por la presente invención pueden inmovilizarse sobre polímeros reticulados hidrófilos, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 7.951.885.

El término "matriz de afinidad" o "matriz de cromatografía de afinidad", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a un soporte sólido sobre el cual se une un ligando de cromatografía de afinidad (por ejemplo, basado en el dominio C de la proteína A). El ligando es capaz de unirse a una molécula de interés a través de la interacción de afinidad (por ejemplo, una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) que se debe purificar o eliminar de una mezcla.

El término "proteína objetivo" o "proteína de interés", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a cualquier proteína que pueda purificarse utilizando el dominio C de la proteína A, o una variante o derivado de la misma. En diversas realizaciones, la proteína objetivo es una proteína que contiene Fc tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina de una proteína de fusión de Fc.

El término "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consisten en dos cadenas pesadas y dos ligeras, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena única" o "anticuerpo de cadena única" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, por enlaces peptídicos intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de la cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (p. ej., que comprenden de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina β plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se mencionan en la presente memoria como "constantes" o "variables", en función de la falta relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica "regiones" de anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo intacto o completo o una cadena de anticuerpo. Los fragmentos pueden obtenerse a través del tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o una cadena de anticuerpo. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Los fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv.

Los métodos de la invención se pueden usar para purificar cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que pueda unirse a la proteína A, incluidos, entre otros, los anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos purificados usando los métodos descritos en la presente memoria son anticuerpos terapéuticos.

Los anticuerpos terapéuticos ejemplares incluyen Herceptin™; Rituxan™; Avastin™; Bexxar™; Campath™; Erbitux™; Humira™; Raptiva™; Remicade™; ReoPro™; Prolia®; Xgeva®; Simulect™; Synagis™; Xolair™; Zenapax™; Mylotarg™; y Vectibix™. Las proteínas de fusión de Fc ejemplares incluyen la fusión a formas solubles de receptores o enzimas y variantes, derivados o análogos de los mismos, tales como, por ejemplo, ENBREL®.

Se entiende que la proteína objetivo purificada utilizando los métodos descritos en la presente memoria es una que contiene una región Fc y, por lo tanto, es susceptible de purificación por la Proteína A. El término "región Fc" o "Fc", como se usa en la presente memoria, se refiere a aquellos residuos de aminoácidos de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la proteína A. La región Fc es la región de la cola cristalizante de un anticuerpo, e interactúa con los receptores de la superficie celular llamados receptores de Fc.

Los términos "unión a Fc", "se une a una porción Fc" o "unión a una porción Fc" se refieren a la capacidad de un ligando de afinidad descrito en la presente memoria de unirse a la parte constante (Fc) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un ligando de acuerdo con la presente invención se une a una porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG4 humanas) con una afinidad de al menos 10⁻⁷ M, o al menos 10⁻⁸ M, o al menos 10⁻⁹ M.

Como se usa en la presente memoria, el término "fragmento(s)" se refiere a una porción de una proteína que contiene Fc de longitud completa tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina. Los ejemplos de fragmentos incluyen los fragmentos Fab, moléculas de anticuerpos de cadena única, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Las proteínas que contienen Fc que se purifican utilizando los métodos descritos en la presente memoria pueden expresarse utilizando cualquier sistema de expresión o tipo de célula adecuado. En algunas realizaciones, una proteína que contiene Fc se expresa en una célula de mamífero, por ejemplo, células CHO o NS0, hibridomas, células de ratón, etc. En otra realización, una proteína que contiene Fc se expresa usando un cultivo de células no mamíferas (por ejemplo, células de insectos, células de levadura, *Escherichia coli*, etc.). Después de la expresión en un cultivo celular, las especies insolubles se eliminan típicamente usando un método de clarificación tal como, por ejemplo, filtración en profundidad, centrifugación, floculación/precipitación (por ejemplo, precipitación ácida o polímero sensible a estímulos). Este cultivo celular clarificado se carga típicamente en una columna de Proteína A para separar la proteína que contiene Fc de las impurezas solubles, como las proteínas de la célula huésped, el ADN, los virus u otras impurezas.

Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido purificado" o "proteína purificada" es un producto eluido de una etapa de afinidad con Proteína A que utiliza el gradiente de pH o los métodos de etapas de pH como se describe en la presente memoria. Los polipéptidos/proteínas purificados preferiblemente contienen principalmente monómeros polipeptídicos.

Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido no purificado", "proteína no purificada" o "carga de proteína" es un polipéptido o proteína del material de carga o material de partida antes de la etapa de purificación por afinidad con Proteína A.

Como se usa en la presente memoria, el término "pureza de una proteína que contiene Fc" se define como la especie monomérica de la proteína objetivo (es decir, una proteína que contiene Fc) respecto de la proteína total eluida de una columna de cromatografía de Proteína A, que emplea un ligando basado en el dominio C de la proteína A inmovilizado sobre un soporte sólido. Por consiguiente, la pureza se puede calcular mediante la proporción de monómero total respecto de la proteína total en la mezcla de elución. La proteína total puede contener uno o más de fragmentos de proteínas, agregados, especies monoméricas de la proteína objetivo y sus variantes. En diversos métodos descritos en la presente memoria, la pureza de una proteína que contiene Fc se incrementa en al menos un 5%, o al menos un 10%, o al menos un 15%, o al menos un 20%, o al menos un 25%, o al menos un 30%, o más, respecto de los métodos de cromatografía de proteína A descritos en la técnica anterior.

Típicamente, en el caso de un método de cromatografía de Proteína A descrito en la presente memoria, después de cargar la columna de Proteína A con una muestra que contiene la proteína objetivo, la proteína objetivo se eluye de la columna utilizando un tampón de elución adecuado, al mismo tiempo que se mide la absorbancia UV a 280 nm, lo que da como resultado un perfil de elución para la proteína objetivo. El perfil de elución incluye típicamente un pre-pico, un pico y un post-pico. Una vez que comienza la elución, las fracciones se recolectan a volúmenes de columna predeterminados cuando la absorbancia de la proteína medida a 280 nm alcanza un cierto nivel, por ejemplo, 50 mAU o superior, y termina cuando la absorbancia a 280 nm alcanza, por ejemplo, menos de 50 mAU. La fracción o fracciones de elución con el valor alto de absorbancia son las que forman el pico y contienen la proteína objetivo. Se pueden mezclar para generar la mezcla de elución que contiene la proteína objetivo. Dicha fracción o fracciones generalmente se hallan dentro de la mitad de un perfil de elución. A su vez, la fracción o fracciones con menor absorbancia, que aparecen al principio o al final del perfil de elución, generalmente se descartan porque contienen agregados de proteínas.

Como se usa en la presente memoria, el término "rendimiento de proteína que contiene Fc" se define como la cantidad de proteína recolectada en la mezcla de elución respecto de la cantidad total de proteína eluida de una columna de cromatografía de Proteína A. En algunas realizaciones, la mezcla de elución contiene fracciones que comienzan con un valor de absorbancia de 500 mAU o más, y terminan con un valor de absorbancia de 500 mAU o menos.

Como se usa en la presente memoria, el término "pre-pico" se refiere a la porción del perfil de elución para una proteína que se recolecta antes de una absorbancia UV específica, y no se incluye en la mezcla de elución. En algunas realizaciones, el pre-pico se refiere a la proteína total recuperada antes de que la absorbancia alcance 500 mAU o más.

Como se usa en la presente memoria, el término "post-pico" se refiere a la porción del perfil de elución para una proteína que se recolecta después de una absorbancia UV específica. En algunas realizaciones, el post-pico se refiere a la proteína total recuperada después de que la absorbancia alcance 500 mAU o menos.

El término "agregado proteico" o "agregados proteicos", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a una asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés, por ejemplo, una proteína que contiene Fc. La asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés puede surgir por cualquier medio que incluye, pero pero sin limitación, interacciones no covalentes como, por ejemplo, interacciones carga-carga, hidrófobas y van der Waals; e interacciones covalentes tales como, por ejemplo, interacción disulfuro o reticulación no reducible. Un agregado puede ser un dímero, un trímero, un tetrámero o un multímero mayor que un tetrámero, etc. El término "agregados de proteínas" incluye cualquier especie de orden superior de la proteína que contiene Fc.

La concentración de agregados se puede medir en una muestra de proteína utilizando una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), un método bien conocido y ampliamente aceptado en la técnica (véase, por ejemplo, Gabrielson

et al., J. Pharm. Sci., 96, (2007), 268-279). En algunas realizaciones, las concentraciones relativas de especies de diversos pesos moleculares se miden en las fracciones de elución utilizando la absorbancia UV, mientras que los pesos moleculares de las fracciones se determinan mediante la calibración del sistema siguiendo las instrucciones del fabricante de la columna. Otros métodos para medir la concentración de agregados incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel y dispersión de luz.

Como se usa en la presente memoria, el término "monómero(s)" se refiere a una sola unidad de una proteína que contiene Fc. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, un monómero consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; en el caso de un anticuerpo de un solo brazo, un monómero consiste en una cadena pesada y una cadena ligera.

El término "ligando", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula biológica basada en el dominio C de la proteína A que está inmovilizada sobre un soporte sólido (por ejemplo, una superficie porosa) y que es capaz de atraer una proteína que contiene Fc. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el ligando comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 3, o variantes, fragmentos o derivados de la misma. En algunas otras realizaciones descritas en la presente memoria, el ligando comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 4, o variantes, fragmentos o derivados de la misma.

El término "soporte sólido" se refiere en general a cualquier material (poroso o no poroso) al que está unido un ligando. La unión de los ligandos al soporte sólido puede ser a través de un enlace covalente, como en el caso del injerto, o mediante recubrimiento, adhesión, adsorción y mecanismos similares. Los ejemplos de soportes sólidos utilizados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, membranas, perlas porosas, fibras alargadas o porosas, monolitos. Las membranas adecuadas incluyen, pero sin limitación, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) modificado en la superficie o sin modificar, poliéter sulfona (PES), poliéter éter sulfona (PEES), celulosa, nailon, politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno de peso molecular ultra-alto (UPE). Las perlas porosas adecuadas incluyen, pero sin limitación, sílice, cerámica, poliestireno, poliacrilato, polimetacrilato, poli(éter vinílico), poli(alcohol vinílico), polisacárido que incluye agarosa y celulosa. Las fibras alargadas o porosas adecuadas incluyen, pero sin limitación, nailon, celulosa, PES. Los monolitos adecuados incluyen, entre otros, sílice, poliestireno, polimetacrilato y poliacrilato, poliacrilamida, poli(alcohol vinílico). En algunas realizaciones, el ligando se inmoviliza en un medio de cromatografía tal como, por ejemplo, una perla porosa, que luego se empaqueta en una columna de cromatografía para su uso.

El término "densidad de carga" es la cantidad de la muestra que contiene una proteína que contiene Fc cargada en una columna de cromatografía por volumen de medio de cromatografía. La densidad de carga se mide en g/l. En algunas realizaciones, la muestra se carga con una densidad de carga de 5 g/L, o 10 g/L o 12 g/L, o 15 g/L, o 20 g/L, o 30 g/L, o 40 g/L o más.

Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Varios tampones que pueden emplearse 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),

El "tampón de equilibrio" de la presente memoria es el que se usa para preparar el soporte sólido (con proteína A inmovilizada) para cargar la proteína objetivo.

El "tampón de lavado" se usa en la presente memoria para referirse al tampón que se hace pasar por el soporte sólido (con la proteína A inmovilizada) después de la carga y antes de la elución de la proteína objetivo.

II. Cromatografía de proteína A

La cromatografía de proteína A es una forma de cromatografía de afinidad, más comúnmente utilizada para la purificación de proteínas que contienen Fc como, por ejemplo, inmunoglobulinas o anticuerpos. En general, una proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene Fc) se expresa en un cultivo celular adecuado y la alimentación del cultivo celular se somete a clarificación, antes de cargar la alimentación clarificada en un medio de cromatografía de Proteína A, por ejemplo, empaquetado en una columna de cromatografía.

La cromatografía de proteína A generalmente emplea un soporte sólido tal como, por ejemplo, una perla porosa o una resina, que tiene un ligando de proteína A adecuado inmovilizado sobre la misma. El soporte sólido unido a la Proteína A se empaqueta luego en una columna de cromatografía. La columna se puede equilibrar primero con un tampón de equilibrio adecuado. El alimento clarificado que contiene la proteína objetivo (por ejemplo, una proteína que contiene Fc) se pone en contacto con el soporte sólido en la columna cargando la columna con una muestra que contiene una proteína que contiene Fc (por ejemplo, un alimento de cultivo celular clarificado). Normalmente, las impurezas solubles, como las proteínas y el ADN de la célula huésped, no se unen a la Proteína A y, por lo tanto, se eliminan en el flujo continuo y se desvían a los residuos. Posteriormente, la proteína que contiene Fc unida se eluye de la columna de cromatografía de Proteína A por exposición a un tampón de elución adecuado. Los caudales típicos para la elución varían desde 60 volúmenes de columna (VC) por hora hasta 5 VC por hora. En caso de elución en gradiente, la elución típica se realiza en 5 a 60 volúmenes de columna.

- Como se describe en la presente memoria, la elución de la proteína que contiene Fc se puede realizar utilizando dos métodos diferentes. En algunas realizaciones, se mezclan un tampón de pH alto y un tampón de pH bajo para generar un gradiente de pH que varía de pH 7,0 a 3,0. En algunas realizaciones, el gradiente de pH comienza en 7,0, o aproximadamente 6,8, o aproximadamente 6,6, o aproximadamente 6,4, o aproximadamente 6,2, o aproximadamente 6,0, o aproximadamente 5,8, o aproximadamente 5,6, o aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,2 o aproximadamente 5,0, o aproximadamente 4,8, o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,0, y el gradiente de pH finaliza en 3,0, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,6 o aproximadamente 3,8.
- La proteína eluida se recolecta en fracciones de volumen fijo para un análisis adicional del contenido de monómeros frente al de agregados.
- En algunas realizaciones, dos o más tampones de diferentes valores de pH se usan secuencialmente en un orden descendente de valores de pH para eluir la proteína que contiene Fc unida a la proteína A. En algunas realizaciones, el primer tampón usado para la elución por etapas tiene un pH de 4,4, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,0, o aproximadamente 3,8, o aproximadamente 3,6; y un segundo tampón utilizado para la elución por etapas tiene un pH de 3,5, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,3, o aproximadamente 3,2, o aproximadamente 3,1, o aproximadamente 3,0.
- En una realización específica, el primer tampón tiene un pH de alrededor de 3,75 y el segundo tampón tiene un pH de alrededor de 3,0. La proteína eluida se recolecta en fracciones de volumen fijo para un análisis adicional del contenido de monómeros frente al de agregados.
- En algunas realizaciones, la elución por etapas se utiliza para eluir la proteína que contiene Fc unida a la Proteína A, donde se usan pequeños cambios del pH para la elución de la proteína en múltiples etapas a lo largo del tiempo. Posteriormente, se pueden combinar múltiples mezclas de elución para recuperar la proteína que contiene Fc.
- En algunas realizaciones, la elución por etapas emplea una serie de etapas de cambios pequeños de pH en orden decreciente de pH, y cada etapa de pH difiere en un valor de pH de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 respecto de la etapa de pH anterior. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el punto más alto del pH es de alrededor de 5,0, y disminuye de manera escalonada en un valor de pH que varía de 0,1 a 0,5, con el punto bajo del pH alrededor de 3,0. En una realización particular, la serie de etapas de cambios pequeños de pH incluyen valores de pH en el orden de: 5,0; 4,8; 4,6; 4,4; 4,2; 4,0; 3,8; 3,6; 3,4; 3,2 y 3,0.
- También pueden usarse tampones adicionales en los procesos, que facilitan la unión de la proteína al ligando de proteína A. Tales tampones tendrán típicamente un pH más alto que los tampones usados para el método de elución por etapas.
- III. Tampones ejemplares utilizados en los métodos descritos en la presente memoria
- Como se discutió anteriormente, una columna de cromatografía de Proteína A se equilibra típicamente antes de cargar la columna con la muestra que contiene una proteína que contiene Fc. En algunas realizaciones, el tampón de equilibrio utilizado es isotónico y tiene un pH que varía de 6,0 a 8,0. Un tampón de equilibrio ejemplar contiene Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, a pH 7,1.
- Otro tampón que se emplea típicamente durante la cromatografía de proteína A es un tampón de carga. El tampón de carga se utiliza para cargar la mezcla de la proteína que contiene Fc y los agregados de proteínas en el soporte sólido sobre el que está inmovilizada la Proteína A. A menudo, los tampones de equilibrio y carga son el mismo.
- La proteína que contiene Fc unida a la proteína A se eluye posteriormente con un tampón de elución. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el tampón de elución contiene un tampón de pH alto y un tampón de pH bajo, formando así un gradiente de pH que se forma ajustando el porcentaje del tampón de pH alto y el tampón de pH bajo en el tampón de elución. En algunas realizaciones, el tampón de elución tiene un pH que varía de 7,0 a 3,0 o de 6,0 a 3,0. Los valores de pH que se usan en la presente memoria se miden sin la presencia de ninguna proteína.
- Los ejemplos de tampones de pH que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, tampones Tris, fosfato, acetato, citrato, ácido fórmico y amonio, así como combinaciones de estos. Los tampones preferidos son los tampones de citrato, acetato y ácido fórmico.
- En algunas realizaciones, el punto alto del gradiente de pH varía de pH 5,1 a 6,0, y el punto bajo del gradiente de pH varía de pH 3,0 a 3,7.
- En caso de elución por etapas, así como en caso de uso de una serie de etapas de cambios pequeños de pH, se utilizan dos o más tampones de forma secuencial en un orden de valores de pH descendente para crear las etapas. Estos tampones podrían prepararse previamente utilizando tampones similares a los descritos anteriormente, o mezclarlos manteniendo su pH utilizando el sistema de cromatografía.
- Sin desear limitarse por la teoría, se contempla que, en algunas realizaciones, el método de elución en gradiente de pH se puede usar en combinación con el método de elución por etapas de pH, por ejemplo, uno después del otro.

IV. Ligandos ejemplares utilizados en los métodos descritos en la presente memoria

Los métodos de acuerdo con la presente invención emplean ligandos de proteína A basados en el dominio C de la proteína A. En algunas realizaciones, un ligando usado en los métodos descritos en la presente memoria comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 3. En otras realizaciones, un ligando usado en los métodos descritos en la presente memoria comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 4.

V. Métodos para medir el nivel de agregados de proteínas en la mezcla de elución que contiene la proteína que contiene Fc

Las proteínas pueden agregarse o plegarse mal. La proteína objetivo deseada (es decir, el monómero) a menudo se co-purifica con agregados de proteínas, cuando se usa cromatografía de afinidad, por ejemplo, cromatografía de proteína A. En consecuencia, los agregados de proteínas a menudo terminan en la mezcla de elución que contiene la proteína objetivo, y la mezcla de elución típicamente se somete a una o más etapas subsiguientes para eliminar dichos agregados. Tales etapas adicionales pueden involucrar técnicas de cromatografía que separan los agregados en función de su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Las técnicas ejemplares incluyen, pero sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto o cromatografía de exclusión por tamaño. Estas técnicas suelen eliminar los agregados de proteínas después de la etapa de la proteína A. Sin embargo, cada uno de estos métodos requiere tampones, resinas o sorbentes adicionales para una purificación adicional, que da como resultado un tiempo de procesamiento más largo y costos más altos.

Los métodos descritos en la presente memoria dan como resultado la eliminación de agregados de proteínas antes y después de la proteína objetivo durante la etapa de elución de la Proteína A, lo que aumenta la pureza general del producto y reduce el número de etapas adicionales que normalmente se requieren para eliminar los agregados de proteínas, o evita la necesidad de utilizar una o más etapas adicionales.

Como se demuestra en la presente memoria, el nivel de agregados de proteínas en la mezcla de elución que contiene la proteína objetivo es significativamente menor respecto de los métodos descritos en la técnica anterior, que solo eliminan los agregados de proteínas después de la elución de la proteína objetivo. En consecuencia, se aumenta la pureza de la proteína objetivo en la mezcla de elución, medida por la proporción de monómero de proteína frente a la proteína total.

Los niveles de agregados de proteínas pueden medirse en las diversas fracciones de elución utilizando varios métodos conocidos en la técnica y los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los agregados de proteínas pueden medirse utilizando dispersión de luz dinámica, cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión, fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, electroforesis en gel, fluorescencia o detección de colorante fluorescente.

La cromatografía de exclusión por tamaño es de fácil acceso y es a menudo la herramienta de elección. La cromatografía de exclusión por tamaño separa las especies en función del peso molecular, donde se utiliza el área bajo el cromatograma UV para cuantificar las cantidades relativas de las especies monoméricas, los agregados y los fragmentos.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de ligandos de proteína A

Los genes sintéticos que codifican dos ligandos de Proteína A basados en el dominio C se obtienen de DNA 2.0 (Menlo Park, CA). Las secuencias de aminoácidos de estos ligandos se exponen en las SEQ ID N°: 3 y 4.

El extremo 5' de cada gen sintético incluye un codón para una metionina iniciadora. Los extremos 5' y 3' de cada gen contienen sitios de restricción NdeI y BamHI, respectivamente. Estos genes sintéticos, así como el vector de expresión que se utiliza, es decir, pET11a, se digieren con NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA), los fragmentos de ADN se separan en un gel de agarosa TAE al 0,7% y los fragmentos de ADN apropiados se extraen y se purifican utilizando el kit de extracción de gel de QIAGEN (Valencia, CA). Los insertos purificados se ligan en el esqueleto de un vector pET11a o cualquier otro vector de expresión adecuado utilizando ADN ligasa de T4 (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA).

La reacción de ligadura se transforma en *E. coli* DH5 α competentes (INVITROGEN, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante, y se colocan en placas Technova LB que contienen 100 μ g/mL de ampicilina y se cultivan durante la noche a 37 ° C. Para obtener el ADN purificado, se recolectan colonias individuales para el cultivo durante la noche en LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina. El ADN se purifica utilizando kits mini-prep para centrifugación de QIAGEN (Valencia, CA). La identidad de los plásmidos recombinantes se confirma mediante análisis de la digestión de restricción utilizando NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA).

Ejemplo 2: Expresión y purificación de los ligandos de proteína A

Los ligandos de Proteína A descritos en el Ejemplo 1 se expresan en una cepa de *Escherichia coli* tal como la cepa

BL21 (DE3) (PROMEGA, Madison WI) utilizando un vector pET tal como pET11a.

5 Se selecciona una única colonia de una placa y se cultiva durante la noche a 37 ° C en medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El cultivo durante la noche se diluye 100 veces en medio LB fresco que contiene 100 µg/ml de ampicilina y se hace crecer hasta una densidad celular de manera que la densidad óptica a 600 nm sea ~ 0,8. Después de la adición de 1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido, las células se cultivan durante dos horas adicionales. La expresión se confirma mediante análisis SDS-PAGE y transferencia de Western.

10 Las células se recogen por centrifugación (4000 rpm, 4 ° C, 5 minutos) y se resuspenden en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20 mM. Las células se lisan mediante sonicación y los residuos celulares se sedimentan mediante centrifugación (4000 rpm, 4 ° C, 30 minutos). Los ligandos de la proteína A se purifican utilizando una resina de afinidad de IgG de 50 ml (hlgG policlonal inmovilizada en un vidrio de poro controlado), aplicando ~ 500 ml de lisado celular. Las columnas se lavan con 30 ml de solución salina tamponada con fosfato y los ligandos de la Proteína A se eluyen en ácido cítrico 0,1 M, pH 3. Los ligandos se dializan durante la noche en agua de 18 mega-Ohm Milli-Q® (EMD MILLIPORE). Billerica, MA). La concentración de proteína se confirma utilizando el espectrómetro UV basándose en el coeficiente de extinción teórico (Pace et al., Protein Science 4: 2411 (1995)).

15 Ejemplo 3: Fijación de ligandos de proteína A a un soporte sólido

Posteriormente a la generación y expresión de diversos ligandos, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se inmovilizan a través de una unión multipunto a un soporte sólido.

20 En un experimento ejemplar, el ligando de la Proteína A (SEQ ID NO: 3, 10 ~ 20 mg/ml) se inmoviliza en una matriz de base de poli(alcohol vinílico) reticulado descrita en la patente de EE. UU. N° 7.951.885, a través de la reacción de los grupos epoxi en la superficie de la resina y los numerosos grupos amino en el ligando en presencia de Na₂SO₄ 1 ~ 1,1 M durante la noche. Véase, Hermanson *et. al.* Academic Press, 1992, página 118.

El método de acoplamiento del ligando de SEQ ID N°: 4 es similar al proceso anterior.

Ejemplo 4: Generación de alimentación de mAb con agregados

25 Dos proteínas diferentes que contienen Fc, mAb-1 y mAb-2, se purifican utilizando un método de elución en gradiente de pH en diferentes resinas de cromatografía de Proteína A.

30 El material de carga de mAb-1 y mAb-2 se agrega intencionadamente para facilitar el análisis de las diferentes especies en la mezcla de elución. La generación de agregados se realiza utilizando un método previamente desarrollado (véase, por ejemplo, ACS National Meeting 2012, Cataldo et al.). Específicamente, se utiliza un método de ciclos de pH para producir agregados irreversibles y estables en disolución. El mAb purificado se concentra utilizando dispositivos de filtro centrífugos (Amicon Ultra-15, 10.000 NMWL). El pH se eleva a pH 11,0 utilizando NaOH 10 y 1 N con agitación suave y luego se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el pH se reduce lentamente (durante aproximadamente 20 minutos) a pH 5,0 utilizando HCl 6 y 1 M con agitación suave. Este procedimiento se repite 3 veces y luego la solución se filtra con un filtro de jeringa de 0,22 µm y se dializa en el tampón de equilibrio antes de realizar los experimentos de cromatografía.

35 Ejemplo 5: Cromatografía de proteína A de elución en gradiente de pH

40 Los experimentos de cromatografía se llevan a cabo en una plataforma AKTA Avant (GE Healthcare) controlada por el software Unicorn 6.1. Las columnas de proteína A se empaquetan de acuerdo con las pautas del fabricante con MabSelect SuRe™ (GE Healthcare), ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore), resinas A y B con ligando de SEQ ID N°s: 3 y 4, respectivamente, y resina C. La descripción de las diversas resinas de cromatografía utilizadas en los ejemplos descritos en la presente memoria se exponen en la Tabla 1. Los experimentos se llevan a cabo utilizando columnas de 0,66 cm (diámetro interior) x 14 cm (altura del lecho).

Tabla 1 Descripción de las resinas.

Resinas	Nombre comercial	Matriz base	Ligando de la Proteína A
MabSelect SuRe™	MabSelect SuRe™ (GE Healthcare)	Agarosa	Tetrámero del dominio Z modificado
ProSep® Ultra Plus	ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore)	Vidrio de poro controlado	rSPA (proteína A recombinante de longitud completa)
Resina A	-	Poli(alcohol vinílico)	SEQ ID N°. 3
Resina B	-	Poli(alcohol vinílico)	SEQ ID N°. 4
Resina C	-	Poli(alcohol vinílico)	rSPA (proteína A recombinante de longitud completa)

Se utiliza un gradiente de pH para la elución, por lo que una proteína que contiene Fc se une a un ligando de Proteína A a un pH alto y el pH se reduce gradualmente durante la elución. El sistema de cromatografía Avant produce este gradiente de pH al mezclar dos tampones en una proporción cambiante utilizando un sistema de dos bombas donde se mantiene el caudal y el porcentaje del flujo que cada una de las bombas entrega a lo largo del tiempo. Las columnas se equilibran durante 5 volúmenes de columna (VC) con el tampón inicial de ácido cítrico 0,1 M, pH 6,0. Una proteína que contiene Fc (por ejemplo, un anticuerpo) se carga en las columnas y luego se lava con el tampón de equilibrio con 4 VC. El anticuerpo se eluye luego utilizando un gradiente lineal donde el tampón hace la transición hasta ácido cítrico 0,1 M, pH 3,0 a lo largo de 20 VC. Se utiliza un retardo de gradiente de 5 VCs.

Luego, las columnas se limpian con hidróxido de sodio 0,1 M (MabSelect SuRe™, Resina C, Resina A y Resina B) o Guanidina HCl 6 M (ProSep® Ultra Plus). Las columnas se re-equilibran posteriormente. El caudal es de 1,6 ml/min (tiempo de residencia de 3 minutos) para todas las etapas, a excepción de la etapa de carga de proteínas que tiene un caudal de 0,8 ml/min (tiempo de residencia de 6 minutos). Las fracciones se recolectan cada 0,5 VC durante la parte de elución de cada método. La concentración de anticuerpos en cada fracción se determina utilizando una HPLC de la serie Agilent 1100 (Agilent Technologies) con una columna de proteína A POROS® A/20 (Applied Biosystems) de 2,1 mm x 30 mm (ABI 1-5024-12, S/N 33504). Estas fracciones se caracterizan además por las especies de alto peso molecular (HMW) que representan los agregados, utilizando los ensayos analíticos que se describen a continuación. Los experimentos también se llevan a cabo a diferentes densidades de carga que van desde 12 mg/ml de resina a 40 mg/ml de resina.

Ejemplo 6: Determinación de las especies de alto peso molecular en la mezcla de elución mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Se utiliza una HPLC de la serie Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies) para llevar a cabo experimentos de SEC para determinar los niveles relativos de especies de alto peso molecular (HMW), monómeros y especies de bajo peso molecular (LMW) en diferentes muestras. Se utiliza una columna TSKgel SuperSW3000 (TOSOH Biosciences, n° 08541) de dimensiones 3,6 mm (diámetro interior) x 30 cm (altura del lecho) con un tamaño de partícula de 4 µm junto con una columna protectora (TOSOH Biosciences n° 08543). El sistema de tampón utilizado es fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,0 con un caudal de 0,35 ml/min. Las inyecciones de muestra se ajustan de manera que se cargan aproximadamente 10 µg de anticuerpo por muestra (los volúmenes de inyección oscilan entre 1 y 100 µL). Se utilizan blancos que contienen el tampón de fondo con cada conjunto de muestras. También se analizan patrones de filtración en gel (Bio-Rad 151-1901) para confirmar el rendimiento de la columna. Los cromatogramas de HPLC se monitorizan mediante la absorbancia UV a 230 nm y 280 nm. Las curvas de absorbancia se analizan utilizando el software Agilent ChemStation para la integración de los picos. Los valores porcentuales obtenidos a partir de este ensayo se pueden multiplicar por la concentración (mg/ml) de la fracción para obtener la concentración o masa real para cada especie variante de tamaño en la muestra (p. ej., resultado de SEC: 4% de HMW, 92% de monómero, 4% de especies LMW; concentración de muestra: 2 g/L; volumen de muestra: 10 ml; 1,84 g/L de monómero, 18,4 mg de monómero total en la muestra). Los cromatogramas se alinean y se normalizan en función de la mezcla de elución de monómeros, como se muestra en las superposiciones de muestras.

El trazo UV de la porción de elución de los cromatogramas de los gradientes de pH con mAb-1 (densidad de carga de 12 mg/ml) se muestra en la Figura 1A mediante una línea continua. El contenido de agregados correspondiente obtenido de la SEC se muestra mediante cuadrados conectados. La pureza de la mezcla de elución correspondiente y los datos de rendimiento para cortar el pico a 500 mAU se muestran en la Tabla 2. La Figura 1B muestra el rendimiento frente a la pureza del monómero para MabSelect Sure™ y las resinas A y B.

Los cromatogramas de SEC de las diferentes fracciones dentro del perfil de elución demuestran que las fracciones del principio y del final del perfil de las resinas A y B contienen un gran porcentaje (superior al 30%) del agregado total eliminado en los pre-picos. Después de cortar el perfil a 500 mAU, estas especies de agregados se eliminan, lo que produce altos niveles de pureza en la mezcla de elución resultante. La Resina A y la Resina B demuestran una alta pureza de la mezcla de elución, como se resume en la Tabla 2. La Tabla 2 contiene los datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-1 a partir de tres resinas. Los picos de elución se cortan para incluir las porciones que tienen una absorbancia UV a 280 nm mayor de 500 mAU. La pureza en la mezcla se determina después de cortar el pico, y se calcula como la cantidad total de monómero en el conjunto en comparación con la cantidad de proteína total en el conjunto. El rendimiento global se determina después de cortar el pico, y se calcula como la cantidad total de mAb en la mezcla de elución respecto de la cantidad total de proteína recuperada en las fracciones de elución de todo el perfil de elución.

Tabla 2 Datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-1 (densidad de carga 12 mg/ml).

Resina	Monómero en la mezcla (%)	Rendimiento total de 1 mAb (%)	Pre-pico		Post-pico		Agregado Total Eliminado (%)
			% de agregado eliminado	% del total	% de agregado eliminado	% del total	
MabSelect SuRe™	88,9	80,3	6,1	18,9	26,1	81,1	32,2
Resina A	94,6	79,4	25,7	41,1	36,9	58,9	62,6
Resina B	92,6	77,3	22,3	32,8	45,7	67,2	68,0

5 En la Figura 2 se muestran los cromatogramas de SEC representativos desde el principio, la mitad y el final de los perfiles de elución para MabSelect SuRe™ y Resina A. Los perfiles se han normalizado y alineado según el pico de monómero (8-9 minutos). Para MabSelect SuRe™, se observó un gran pico de agregado en las fracciones que eluyeron hacia el final del perfil. Mientras que para la Resina A, se observó un gran pico de agregado en las fracciones de elución temprana y tardía.

10 La Figura 3 muestra el trazo UV de la porción de elución relevante de los cromatogramas de los gradientes de pH con mAb-2 (densidad de carga de 12 mg/mL). El contenido de agregados correspondiente obtenido de la SEC se muestra mediante cuadrados conectados. La correspondiente pureza de la mezcla de elución y los datos de rendimiento para cortar el pico a 500 mAU se muestran en la Tabla 3. Los resultados son similares a los obtenidos con mAb-1.

15 La Tabla 3 contiene los datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-2 a partir de cinco resinas. Los perfiles de elución se cortaron para incluir las porciones que tenían una absorbancia UV a 280 nm superior a 500 mAU. La pureza en la mezcla se determina después de cortar el perfil, y se calcula como la cantidad total de monómero en la mezcla en comparación con la proteína total en la mezcla. El rendimiento global se determina después de cortar el pico, y se calcula como la cantidad total en la mezcla en comparación con la cantidad total recuperada en las fracciones de elución de todo el perfil de elución.

20 La mayor pureza de la mezcla se obtiene con la Resina A. Las fracciones del pre-pico y post-pico de las resinas A y B contienen un gran porcentaje de especies HMW. Los datos de la SEC para ProSep® Ultra Plus y la Resina C indicaron que las especies de agregados están predominantemente en la parte de la cola de los perfiles de elución para estas resinas, como se informó en la técnica anterior. Las resinas A y B eliminan más del 90% de los agregados totales eliminados en los pre-picos, como se resume en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3 Datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-2 (densidad de carga 12 mg/ml).

Resina	Monómero en la mezcla (%)	Rendimiento total de 1 mAb (%)	Pre-pico		Post-pico		Agregado Total eliminado (%)
			% de agregado eliminado	% del total	% de agregado eliminado	% del total	
MabSelect SuRe™	82,2	86,6	11,2	67,5	5,4	32,5	16,6
ProSep® Ultra Plus	81,0	96,9	0	0	7,4	1 00	7,4
Resina A	86,6	82,2	40,5	97,6	1,0	2,4	41,5
Resina B	83,8	85,2	27,9	92,7	2,2	7,3	30,1
Resina C	81,1	98,5	0,7	23,3	2,3	76,7	3,0

25 La Figura 4 muestra los resultados obtenidos para densidades de carga más altas, 40 mg por ml de resina. De forma similar a los resultados de densidad de carga más baja de la Tabla 2, las resinas A y B muestran una gran cantidad de especies agregadas al comienzo y al final de los perfiles de elución.

30 La Tabla 4 muestra los datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-2 de tres resinas a densidades de carga de 40 mg/ml. Los perfiles de elución se cortaron para incluir las porciones que tenían una absorbancia UV a 280 nm superior a 500 mAU. La pureza en la mezcla se determina después de cortar el perfil, y se calcula como la cantidad total de monómero en la mezcla en comparación con la masa total en la mezcla. El rendimiento global se determina después de cortar el perfil, y se calcula como la cantidad total de proteína en la mezcla en comparación con la cantidad total recuperada en las fracciones de elución de todo el perfil de elución. Como se muestra a continuación, las resinas A y B eliminan más del 48% de los agregados totales en esta etapa en los pre-picos.

35

Tabla 4 Datos de rendimiento y pureza para la elución en gradiente de pH de mAb-2 (densidad de carga de 40 mg/ml).

Resina	Monómero en la mezcla (%)	Rendimiento total de mAb (%)	Pre-Pico		Post-pico		Agregado total eliminado (%)
			% de agregado eliminado	% del total	% de agregado eliminado	% del total	
Resina A	82,7	89,0	9,6	48,0	10,4	52,0	20,0
Resina B	81,7	91,7	10,3	70,1	4,4	29,9	14,7

Ejemplo 7: Elución por etapas de pH para la cromatografía de proteína A

- 5 Una proteína que contiene Fc, mAb-2, se purifica utilizando un método de elución por etapas de pH, como se describe a continuación.

Los experimentos de cromatografía se llevan a cabo en un AKTA Avant (GE Healthcare) controlado por el software Unicorn 6.1. Las columnas de proteína A se empaquetan con MabSelect SuRe™, Resina A o Resina B. Los experimentos se llevan a cabo utilizando columnas de 0,66 cm (diámetro interno) x 14 cm (altura del lecho). Las columnas se cualificaron utilizando pruebas de asimetría.

Se utiliza una etapa de pH para la elución, por lo que la proteína se une a un pH alto y el pH se reduce de manera gradual durante la elución. El sistema de cromatografía Avant produce esta etapa de pH al mezclar dos tampones en proporciones específicas mediante un sistema de dos bombas. Las columnas se equilibran a 0,1 M de ácido cítrico, pH 5. El anticuerpo se carga en las columnas y luego se lava con el tampón de equilibrio durante 9 VC. El método está programado para mezclar los tampones para lograr una concentración de ácido cítrico 0,1 M, pH 3,75 durante 10 VC, y luego se reduce a ácido cítrico 0,1 M, pH 3 durante 10 VC. Las columnas se limpian luego con hidróxido de sodio 0,1 M, seguido de un reequilibrio. El caudal se establece en 1,6 ml/min (tiempo de residencia de 3 minutos) para todas las etapas, con la excepción de la etapa de carga de proteínas, que tuvo un caudal de 0,8 ml/min (tiempo de residencia de 6 minutos). Las fracciones se recogen cada 1 VC durante la parte de elución del método. Estas fracciones se caracterizan utilizando los ensayos analíticos descritos anteriormente.

Los resultados de la elución por etapas de pH con mAb-2 se muestran en la Figura 5. La correspondiente pureza de la mezcla de elución y los datos de rendimiento basados en el corte del perfil para excluir las dos primeras fracciones se muestran en la Tabla 5. La Tabla 5 contiene los datos de rendimiento y pureza para la elución por etapas de pH de mAb-2 a partir de tres resinas. Los perfiles de elución se cortan para excluir las dos primeras fracciones. La pureza de la mezcla se determina después de cortar el perfil, y se calcula como la cantidad total de monómero en la mezcla en comparación con la cantidad total de proteína en la mezcla. El rendimiento global se determina después de cortar el perfil, y se calcula como la cantidad total en la mezcla en comparación con la cantidad total recuperada en las fracciones de elución de todo el perfil de elución.

La resina A proporciona el mayor rendimiento total de mAb a la vez que proporciona la mayor pureza de monómero (88,3%). La resina B proporciona la mayor pureza de monómero (92,1%) con un rendimiento general moderado. Esto indica que puede ser útil una estrategia de elución por etapas de pH para reducir los niveles de agregados en la mezcla de productos finales.

Tabla 5 Datos de rendimiento y pureza para la elución por etapas de pH de mAb-2 (densidad de carga 12 mg/ml).

Resina	Monómero en la mezcla (%)	Rendimiento total de mAb (%)
MabSelect SuRe™	86,9	18,5
Resina A	88,3	69,9
Resina B	92,1	44,6

35 Ejemplo 8: Elución por etapas empleando una serie de etapas de cambios pequeños de pH para la cromatografía de proteína A

En este experimento ejemplar, una proteína que contiene Fc, mAb-3, se purifica utilizando una serie de etapas de cambios pequeños de pH, como se describe a continuación.

Los experimentos de cromatografía se llevan a cabo en un AKTA Avant (GE Healthcare) controlado por el software Unicorn 6.1. Las columnas de proteína A se empaquetan con resina A. Los experimentos se llevan a cabo utilizando columnas de 0,66 cm (diámetro interno) x 14 cm (altura del lecho). Las columnas se cualifican utilizando pruebas de asimetría.

Se utiliza una serie de etapas de cambios pequeños de pH para la elución, por lo que la proteína se une a un pH alto

y el pH se reduce de manera gradual durante la elución. El sistema de cromatografía Avant puede producir esta etapa de pH mezclando dos tampones en proporciones específicas utilizando un sistema de dos bombas. La alimentación de anticuerpo inicialmente contiene un 10,5% de agregados. La columna de proteína A se equilibra con ácido cítrico 0,1 M, pH 5 durante 5 VC. La alimentación de anticuerpos se carga en las columnas y luego se lava con el tampón de equilibrio durante 5 VC. Para la elución del anticuerpo, el método está programado para mezclar el tampón de ácido cítrico 0,1 M, pH 5 con el tampón de ácido cítrico 0,1 M, pH 3 para obtener disoluciones de pH 5,0, 4,8, 4,6, 4,4, 4,2, 4,0, 3,8, 3,6, 3,4, 3,2 y 3,0. Cada etapa de pH se mantiene durante 3 VC antes de pasar a la siguiente etapa. Luego, las columnas se limpian con hidróxido de sodio 0,1 M durante 3 VC, seguido de un nuevo equilibrio con ácido cítrico 0,1 M, pH 5 durante 5 VC. El caudal se establece en 1,6 ml/min (tiempo de residencia de 3 minutos) para todas las etapas, con la excepción de la etapa de carga de proteínas que tiene un caudal de 0,8 ml/min (tiempo de residencia de 6 minutos). Las fracciones se recogen cada VC durante la parte de elución del método. Estas fracciones se caracterizan utilizando los ensayos analíticos descritos anteriormente.

Los resultados de la elución por etapas pequeñas de pH con mAb-3 se muestran en la Figura 6. La pureza y los niveles de rendimiento dependen de qué fracciones del pico de elución se seleccionen para la mezcla. En la Tabla 6 se muestran varios escenarios. Si bien los niveles de pureza más altos se pueden lograr mezclando solo las fracciones de pureza elevada, esto puede afectar negativamente al rendimiento. La recuperación casi completa del anticuerpo se logra cuando se mezclan las fracciones de 22-34 VCs. La pureza resultante es del 93%. Al seleccionar solo las fracciones que contienen una alta pureza, es posible mejorar la pureza de la mezcla. Se logra un nivel de pureza del 95% cuando se combinan las fracciones de 26-29 VC, lo que da como resultado un rendimiento de alrededor del 70%. El nivel de pureza es de aproximadamente el 96% cuando se mezclan las fracciones de 27 a 29 VC, lo que da como resultado un rendimiento de aproximadamente el 57%. La pureza en la mezcla se determina después de agrupar las fracciones deseadas, y se calcula como la cantidad total de monómero en la mezcla en comparación con la cantidad total de proteína en la mezcla. El rendimiento global se determina después de mezclar las fracciones, y se calcula como la cantidad total en la mezcla en comparación con la cantidad total recuperada en las fracciones de elución del perfil de elución completo.

Tabla 6 Datos de rendimiento y pureza para la elución por etapas pequeñas de pH de mAb-3 de la Resina A. La pureza inicial del monómero de alimentación es del 89,5%.

VCs mezclados	Monómero en la mezcla (%)	Rendimiento total de mAb (%)
22-34	92,9	99,8
26-32	93,5	89,7
26-29	95,2	70,0
27-29	96,0	57,1

Esto indica que una serie de etapas de cambios pequeños de pH pueden ser útiles para reducir los niveles de agregados en la mezcla final de productos de la Resina A. Al utilizar etapas de cambios pequeños de pH, es posible identificar los niveles de corte de pH deseados para optimizar la pureza y el rendimiento. Este enfoque se puede utilizar para guiar el desarrollo de un proceso simplificado de elución por etapas de pH, como se describió anteriormente en el Ejemplo 7. El proceso simplificado puede contener menos cambios de etapas de pH, que se seleccionan estratégicamente para optimizar la pureza y el rendimiento para un proceso, pureza y rendimiento concretos. Este enfoque se puede utilizar para guiar el desarrollo de un proceso simplificado de elución por etapas de pH, como se describió anteriormente en el Ejemplo 7. El proceso simplificado puede contener menos cambios de etapas de pH, que se seleccionan estratégicamente para optimizar la pureza y el rendimiento para un proceso concreto.

La memoria descriptiva se entiende mejor a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Las realizaciones de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de esta invención, y no debe interpretarse que limiten su alcance. El experto en la materia reconoce fácilmente que esta invención abarca muchas otras realizaciones. La cita de cualquier referencia en la presente memoria no es una admisión de que dichas referencias sean técnica anterior a la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivos celulares, condiciones de tratamiento, etc., utilizados en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie.

Listado de secuencias

<110> EMD MILLIPORE CORPORATION

<120> MÉTODOS PARA AUMENTAR LA PUREZA DE PROTEÍNAS UTILIZANDO LA CROMATOGRAFÍA BASADA

ES 2 735 354 T3

EN PROTEÍNA A

<130> P 13/034 PCT

<140>

5 <141>

<150> 61/783,381

<151> 14-03-2013

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

20

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 2

<211> 174

25 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

gCGgataaca aattcaacaa ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60

aatctgacgg aggagcaacg taacggcttt atccagtccc tgaaggatga tccgtctgtg 120

30 tctaaaagaga tcctggcgga ggcaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

<210> 3

<211> 290

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

40 <400> 3

ES 2 735 354 T3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn
50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
85 90 95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
100 105 110

Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
130 135 140

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp
165 170 175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
180 185 190

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
195 200 205

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
210 215 220

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
225 230 235 240

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu

ES 2 735 354 T3

145		150		155		160									
Ala	Pro	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu
				165					170					175	
His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser
			180						185				190		
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys
		195					200					205			
Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn
	210					215					220				
Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg
225					230					235					240
Asn	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu
				245					250					255	
Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	
			260					265					270		

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir el nivel de agregados de proteínas en una mezcla de elución que contiene una proteína que contiene Fc, y el método comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una muestra que comprende una proteína que contiene Fc y agregados de proteína;
- 5 (b) poner en contacto la muestra con un ligando de Proteína A inmovilizado sobre un soporte sólido, en donde el ligando de Proteína A comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N°: 3 o la SEQ ID N°: 4, de manera que la proteína que contiene la región Fc se une al ligando de Proteína A;
- (c) obtener una mezcla de elución que contiene la proteína que contiene Fc usando:
- 10 i) un método de gradiente de pH que emplea un tampón de pH alto y un tampón de pH bajo;
o
- 15 ii) un método de etapas de pH que emplea dos o más tampones usados secuencialmente en el orden de valores de pH descendentes, en donde en cualquier caso al menos el 30% de los agregados de proteínas se eliminan antes de la elución de la proteína que contiene Fc, además de los agregados de proteínas que se eliminan después de la elución de la proteína que contiene Fc, lo que reduce el nivel de agregados de proteínas en la mezcla de elución.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tampón de pH alto tiene un pH de aproximadamente 6,0 y el tampón de pH bajo tiene un pH de aproximadamente 3,0.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (c) ii) comprende dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o seis o más, o siete o más, u ocho o más, o nueve o más, o diez o más etapas de cambios pequeños de pH, con un pH que oscila entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 3,0.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los tampones utilizados en el método de elución por etapas tiene un pH que varía de 3,6 a 4,4.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que contiene Fc se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la proteína que contiene Fc es un anticuerpo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gradiente de pH abarca de 5 volúmenes de columna a 30 volúmenes de columna.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en vidrio de poro controlado, sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, agarosa, polimetacrilato, poliacrilato, poli(acrilamida), poli(éter vinílico), poli(alcohol vinílico) y poliestireno y sus derivados.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es poli(alcohol vinílico) o poli(éter vinílico).

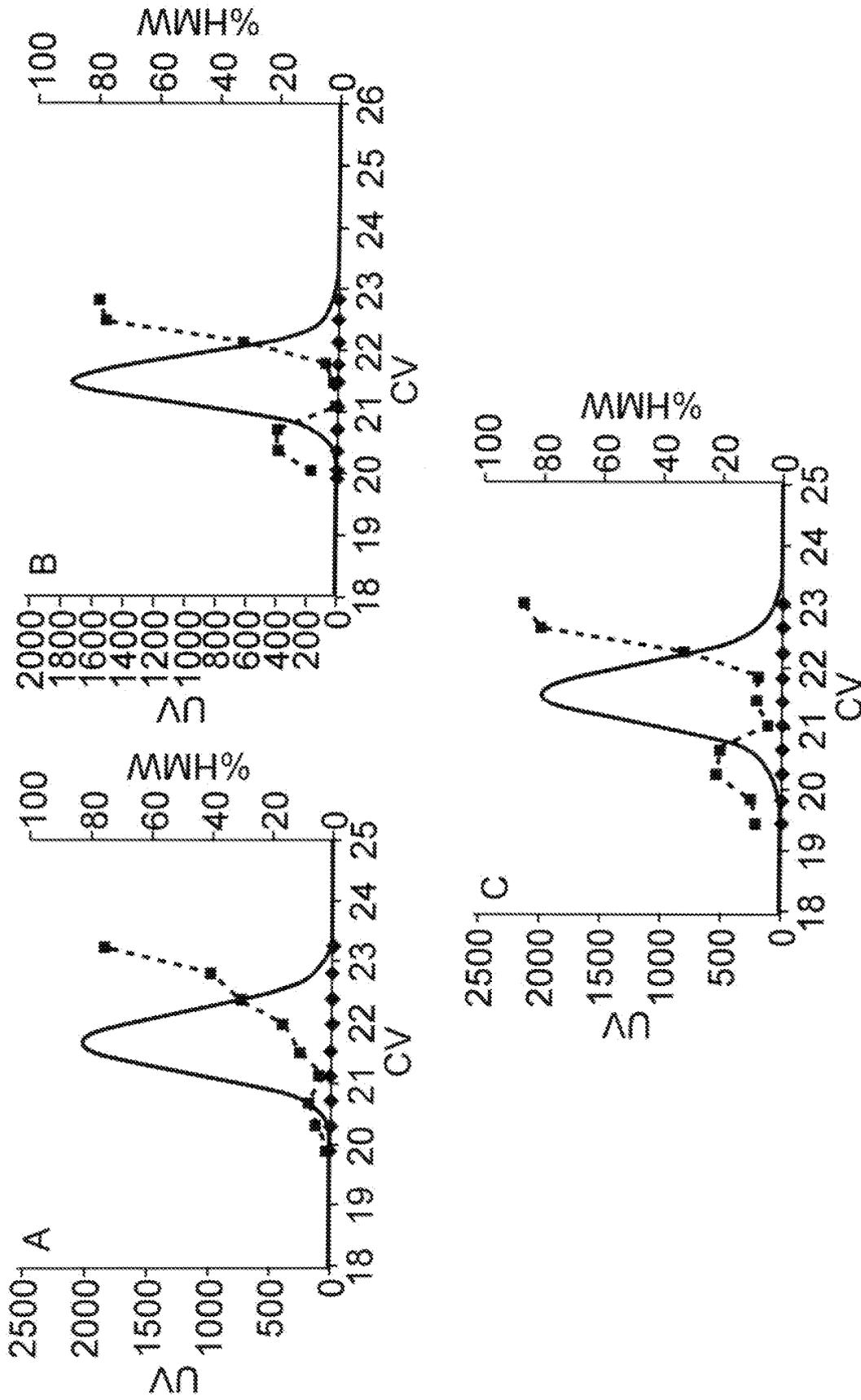


Figure 1A

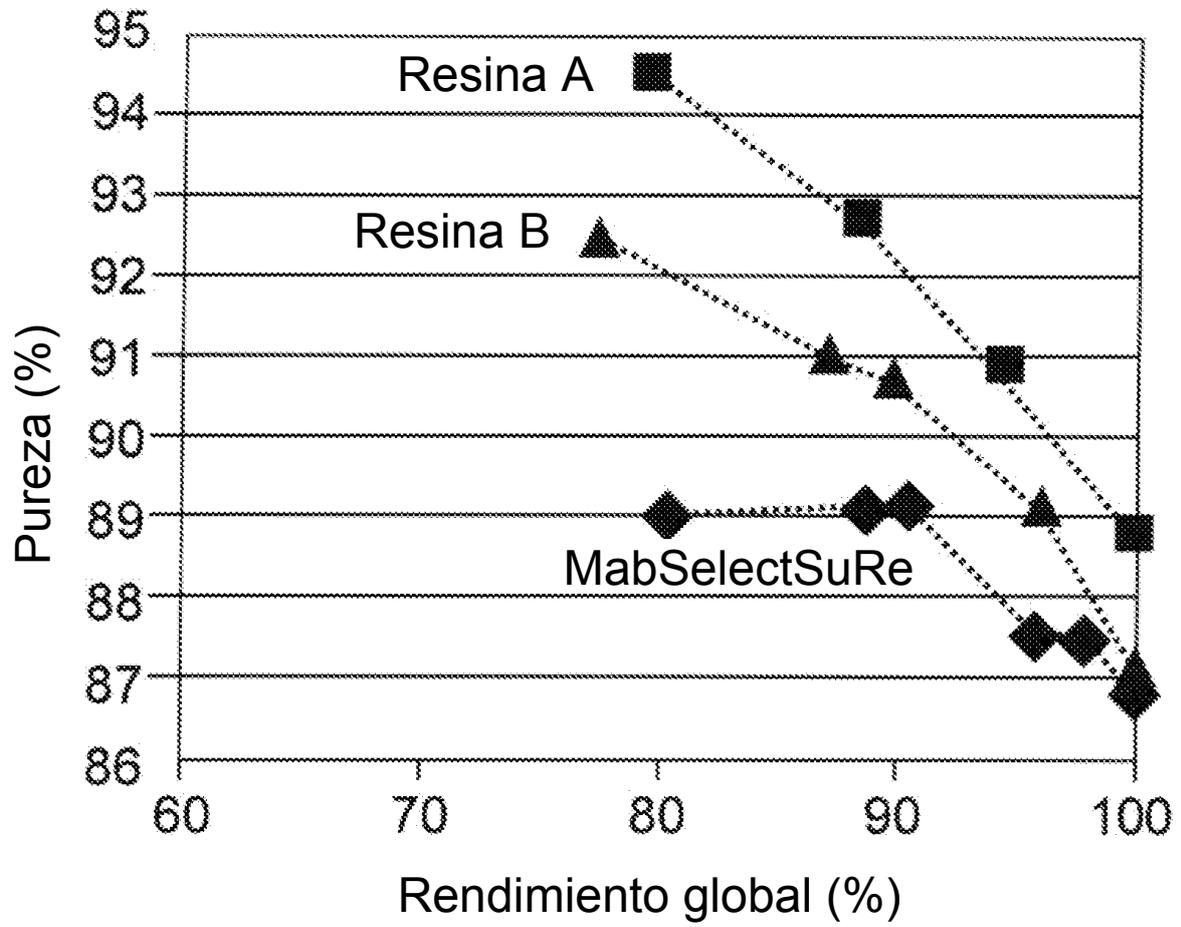


Figura 1B

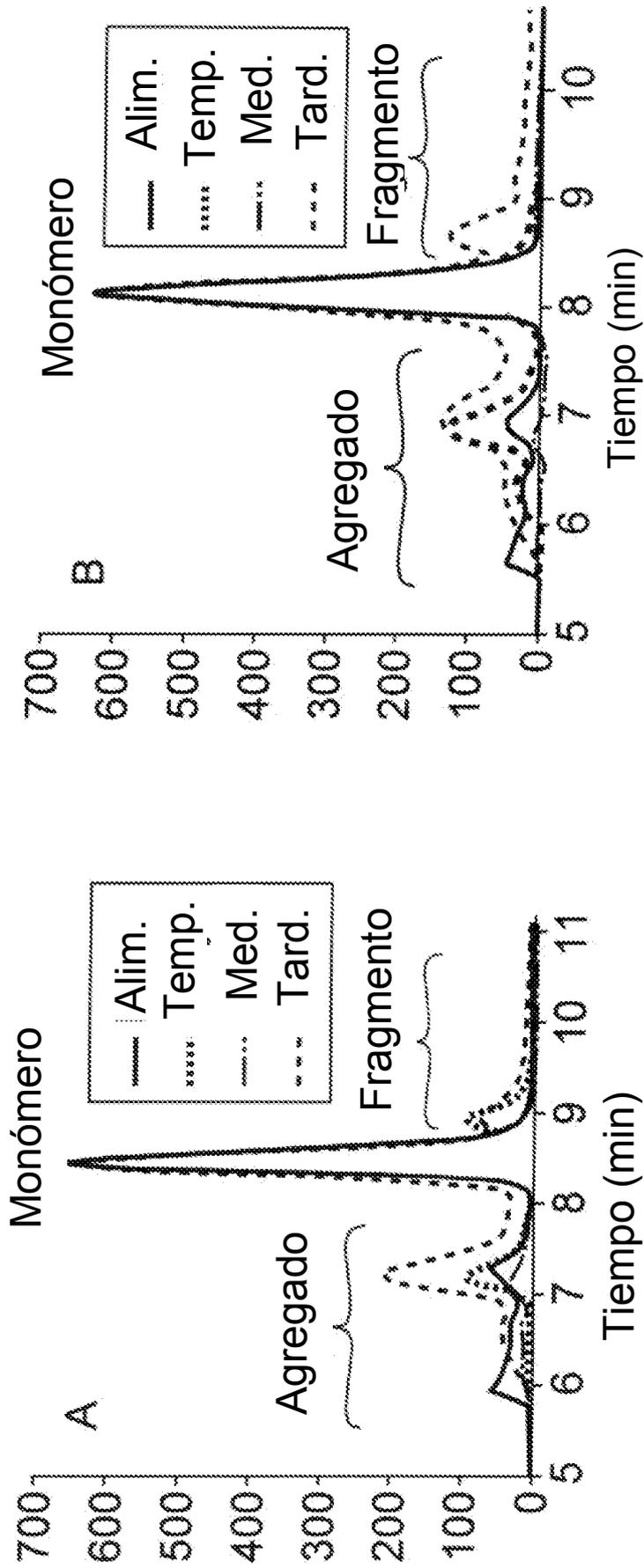


Figura 2

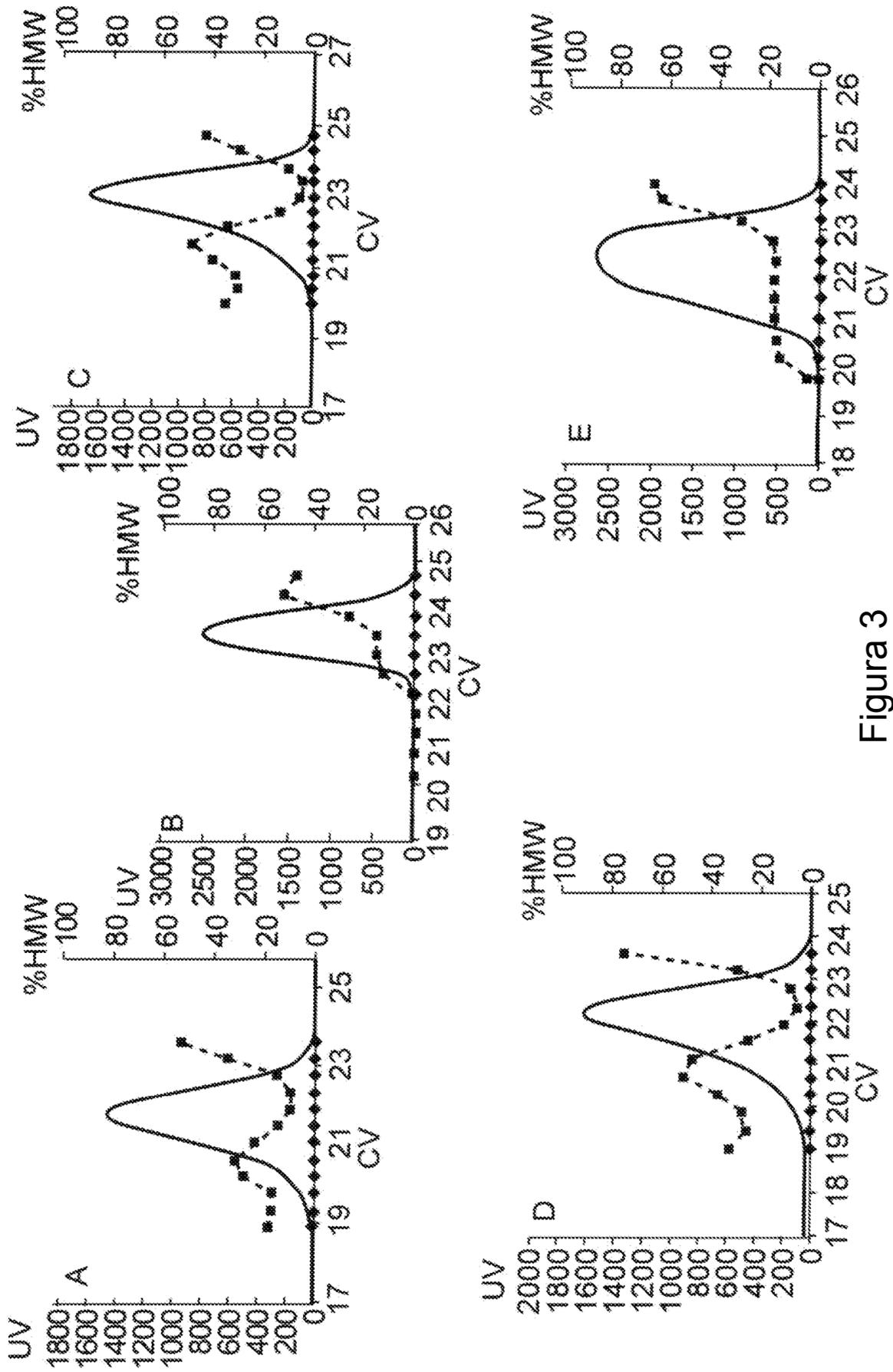


Figura 3

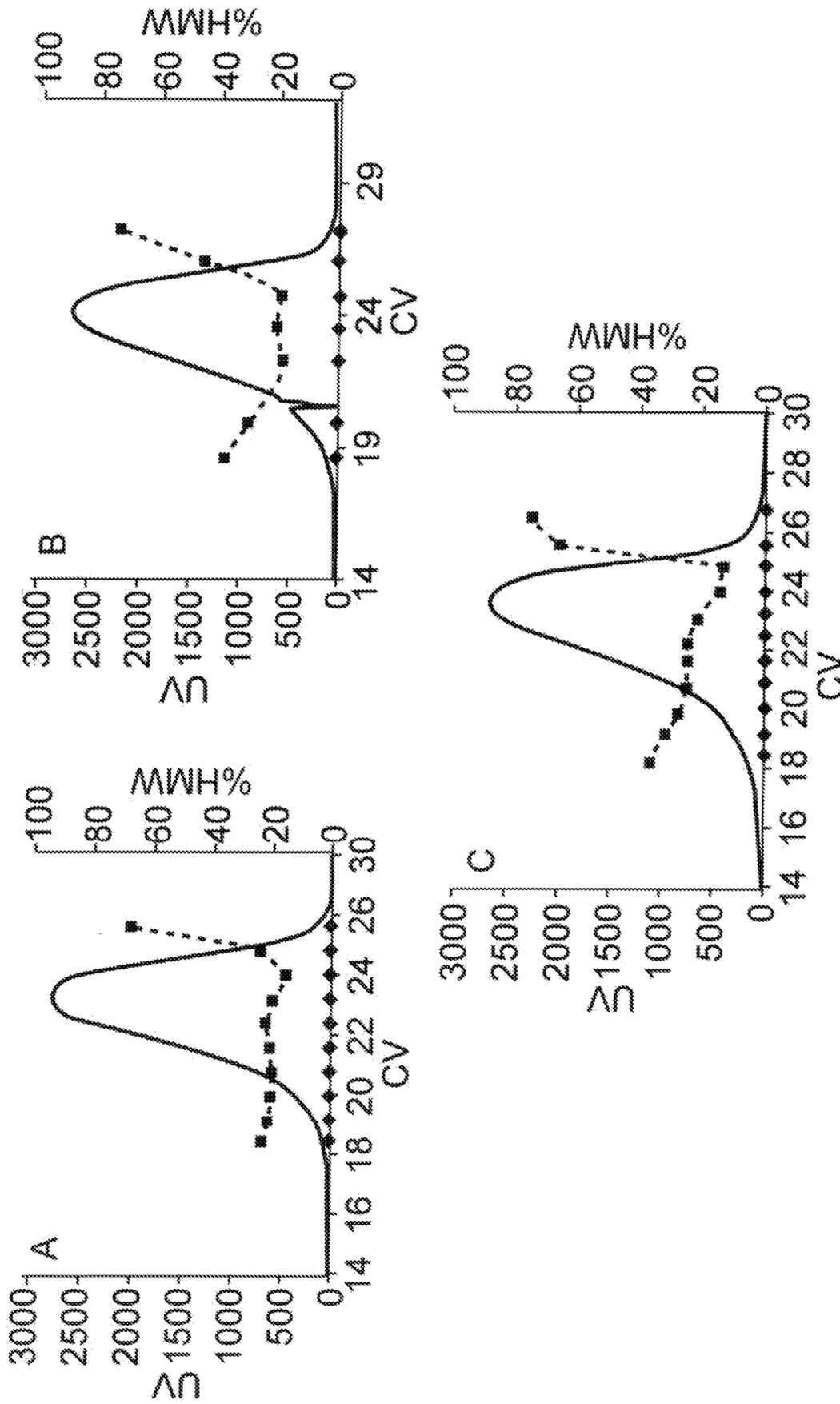


Figura 4

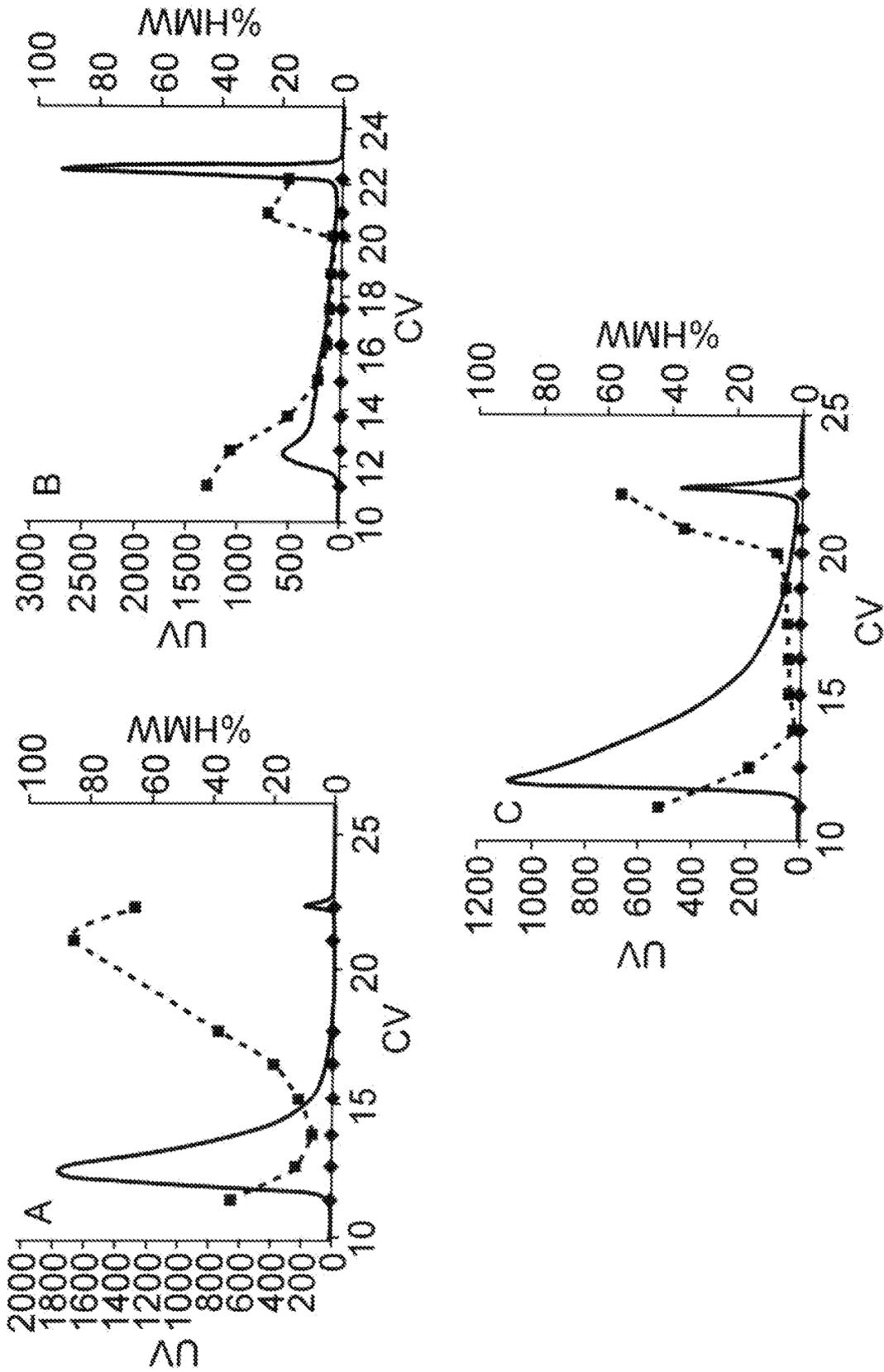


Figure 5

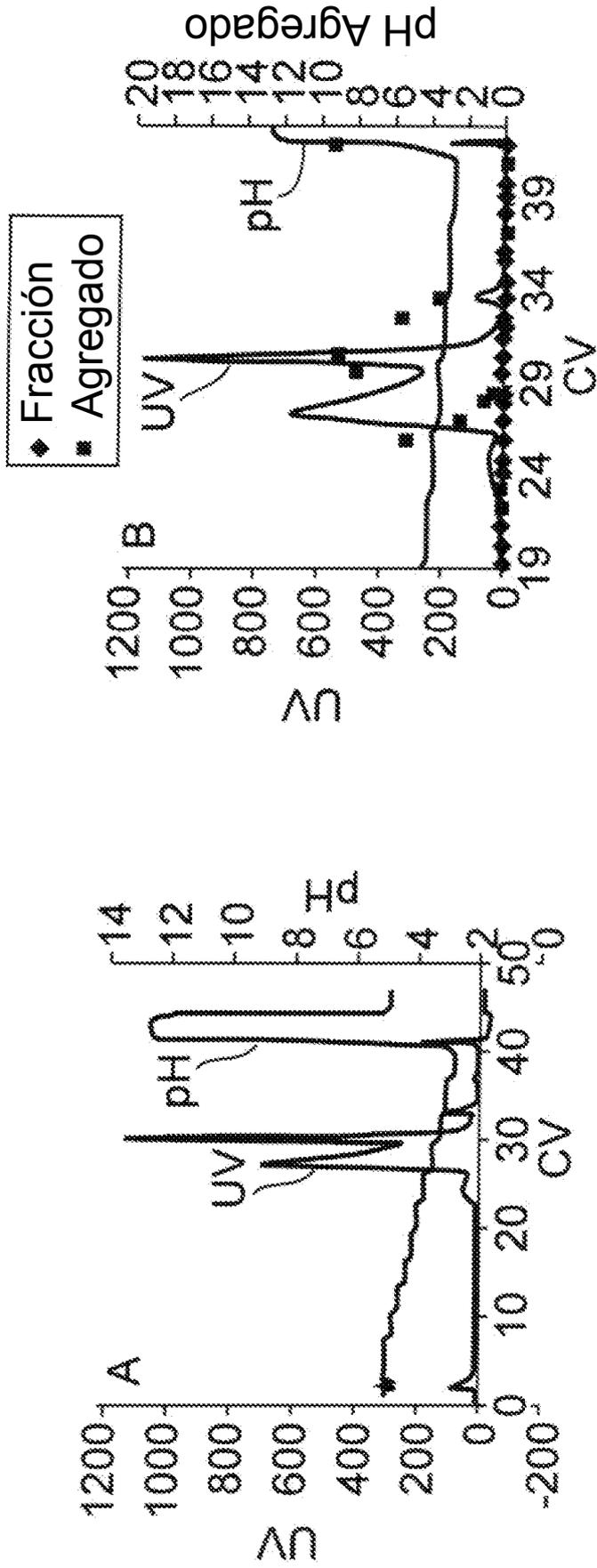


Figura 6