

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 190**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 14189582 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2848625**

54 Título: **Métodos para eliminar un contaminante usando cromatografía de membrana de intercambio iónico de desplazamiento de proteínas indígenas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, ARICK;
BILL, JEROME, JR.;
TULLY, TIMOTHY y
DOWD, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 749 190 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 eliminar un contaminante usando cromatografía de membrana de intercambio iónico de desplazamiento de proteínas indígenas

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a la purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a métodos para eliminar un contaminante usando cromatografía de membrana de intercambio iónico de desplazamiento de proteína indígena.

10

Antecedentes de la invención

La purificación económica a gran escala de proteínas es un problema de importancia creciente para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas se producen por cultivo celular, usando bien líneas celulares eucarióticas o procarióticas manipuladas genéticamente para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las células que se usan normalmente son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, habitualmente proporcionados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos con los que se alimenta a las células y procedentes de los subproductos de las células en sí mismas a una pureza suficiente para su uso como un producto terapéutico humano plantea un reto formidable.

15

20

Los procedimientos para la purificación de proteínas de los residuos celulares inicialmente dependen del sitio de expresión de la proteína. Algunas proteínas se pueden secretar directamente de la célula al medio de crecimiento que la rodea; otras se realizan intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que puede llevarse a cabo por diversos métodos, que incluyen la rotura mecánica, el choque osmótico o los tratamientos enzimáticos. Dicha disrupción libera el contenido completo de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se eliminan por centrifugación diferencial o por filtración. El mismo problema surge, aunque a una menor escala, con proteínas que se secretan directamente debido a la muerte celular natural y a la liberación de proteínas intracelulares de la célula hospedadora en el curso de la ejecución de la producción de proteínas.

25

30

Una vez que se obtiene una solución clara que contiene la proteína de interés, se intenta su separación de las otras proteínas producidas por la célula habitualmente usando una combinación de distintas técnicas cromatográficas. Estas técnicas separan mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño. Hay varias resinas de cromatografía distintas disponibles para cada una de estas técnicas, que permiten adaptar con precisión el esquema de purificación a la proteína particular involucrada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que puede provocarse que las proteínas se muevan a distintas velocidades bajando por una columna larga, alcanzando una separación física que aumenta a medida que pasan más abajo en la columna, o bien que se adhieran de forma selectiva al medio de separación, eluyéndose después de modo diferencial por distintos solventes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna, y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo continuo".

35

40

45

Entre las publicaciones que conciernen a la purificación de proteínas se incluyen Fahrner *et al.*, *Biotechnol 15 Genet Eng Rev.* 2001;18:301-27.

Knudsen *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 907 (2001), 145-154 describe cromatografía de intercambio iónico de membrana para purificación de anticuerpos a escala de proceso. Se refiere al uso de membranas de intercambio catiónico en modo unión y elución y membranas de intercambio aniónico en modo flujo a través.

50

Goodal *et al.*, *Journal of Dairy Science* Vol. 91 N.º 1, 2008 describe un método para separar β -lactoglobulina, BSA y α -lactalbúmina selectivamente para soluciones proteicas únicas o binarias o suero de cuajo usando membranas de intercambio aniónico.

55

Un proceso de purificación a gran escala típico se basa a menudo en el empleo de proteína A inmovilizada como la etapa de captura y purificación primaria en combinación con otras operaciones de columna. Las operaciones de la columna de proteína A en general dan una pureza relacionada con el producto por encima del 98 % con el lavado de la mayoría de las impurezas del proceso en la fracción del flujo continuo. Debido a esto, se considera que las unidades operativas del proceso consiguiente son las etapas de concentración, purificación o limpieza, responsables de la separación de los isómeros relacionados con el producto y la eliminación de las cantidades restantes de las proteínas/ADN de las células hospedadoras, proteína A lixiviada y virus.

60

65

Sumario de la invención

Se desvelan en el presente documento métodos para purificar un polipéptido de una composición que comprende el polipéptido y al menos un contaminante, cuyos métodos comprenden las etapas secuenciales de: (a) pasar la composición a través de una membrana de intercambio iónico, donde el polipéptido y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH lo suficientemente distinto del pI del polipéptido para potenciar la carga del polipéptido y una fuerza iónica baja eficaz para prevenir el apantallamiento de las cargas por los iones del tampón, lo que causa que la membrana se una al polipéptido y el al menos un contaminante, y (b) recuperar el polipéptido purificado del efluente.

En una alternativa, se describe en el presente documento un método para purificar un anticuerpo monoclonal de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal y al menos un contaminante, cuyo método comprende las etapas secuenciales de: (a) pasar la composición a través de una membrana de intercambio catiónico, donde el anticuerpo monoclonal y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del polipéptido y una conductividad de \leq aproximadamente 4 mS/cm, lo que causa que la membrana se una al anticuerpo monoclonal y el al menos un contaminante, y (b) recuperar el anticuerpo monoclonal purificado del efluente.

En otra alternativa, se describe en el presente documento un método para purificar un anticuerpo monoclonal de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal y al menos un contaminante, cuyo método comprende las etapas secuenciales de: (a) pasar la composición a través de una membrana de intercambio aniónico, donde el anticuerpo monoclonal y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que causa que la membrana se una al anticuerpo monoclonal y el al menos un contaminante, y (b) recuperar el anticuerpo monoclonal purificado del efluente.

En un aspecto, el contaminante es una proteína de ovario de hámster chino (CHOP). En otro aspecto, el polipéptido comprende una región CH2/CH3.

En otros aspectos, los métodos además comprenden someter la composición que comprende el anticuerpo monoclonal a una o más etapa(s) de purificación adicional(es) bien antes, durante o después de las etapas de a hasta b, siendo la etapa de purificación, en una alternativa, cromatografía de afinidad de proteína A, y, en otra alternativa, cromatografía de intercambio iónico, usando una columna o membrana que funciona en modo unión/elución, de flujo continuo, o de desplazamiento de proteína indígena.

Además, se describe en el presente documento la preparación de una composición farmacéutica combinando el anticuerpo monoclonal purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Aclaramiento de CHOP para el conjunto de intercambio aniónico de AcMo 1 a pH 5,5, 6,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/h).

Figura 2. Aclaramiento de CHOP para el conjunto de intercambio aniónico de AcMo 2 a pH 5,5 y 6,4 mS/cm y a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/h).

Figura 3. Rendimiento para el conjunto de intercambio aniónico de AcMo 2 a pH 5,5 y 6,4 mS/cm y a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/h).

Figura 4. Aclaramiento de CHOP para el conjunto de proteína A de AcMo 1 a pH 5,5, 3,2 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/h).

Figura 5. Capacidad de unión de CHOP (barras) y anticuerpo (línea) para AcMo 3 a pH 8,0, Mustang™ Q (pequeña escala, 0,35 ml VM, 600 VM/h).

Figura 6. Rendimiento para el conjunto de intercambio catiónico de AcMo 3 a pH 8,0, Mustang™ Q (pequeña escala, 0,35 ml VM, 600 VM/h).

Figura 7. Niveles de CHOP para AcMo 4 a pH 8,0 y 4,0 mS/cm, Mustang™ Q (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/h) y después pH 5,5 y 6,1 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/h).

Figura 8. Aclaramiento de CHOP para AcMo 1 a pH 8,0 y 4,7 mS/cm a lo largo de una ejecución de la columna de flujo rápido de Q Sepharose en modo de flujo continuo a 100 cm/hora (rayas) y después purificando a lo largo de una Mustang™ S de modo discontinuo (rombos) y continuo (gris sólido) a un pH aproximado de 5,5 y 6 mS/cm (pequeña escala, 0,18 ml VM, 538 VM/h).

Figura 9. Aclaramiento de CHOP para AcMo 1 a pH 5,5 y 6 mS/cm, Sartobind™ S (pequeña escala, 0,35 ml VM, 857 VM/h).

Figura 10. Aclaramiento de CHOP para AcMo 1 a pH 5,5 y 6 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM).

Figura 11. Aclaramiento de CHOP para AcMo 1 a pH, 5,5 y 6 mS/cm, Mustang™ S (escala piloto, 10 ml VM, 546 VM/h).

Figura 12. Esquema de la producción de proteínas en el que se ejecuta la cromatografía de intercambio catiónico en modo unión/elución.

Figura 13. Esquema de la producción de proteínas reemplazando la cromatografía de intercambio catiónico

ejecutada en modo unión/elución por una ejecución con membrana de intercambio catiónico en modo de desplazamiento de proteína indígena.

Descripción detallada de la realización preferente

5

Definiciones

En el presente documento, los intervalos numéricos o cantidades precedidos por el término "aproximadamente" incluyen expresamente el intervalo exacto o cantidad numérica exacta.

10

La "composición" para purificar en el presente documento comprende el polipéptido de interés y uno o más contaminantes. La composición se puede "purificar parcialmente" (es decir, se somete a una o más etapas de purificación, tales como cromatografía de proteína A) o se puede obtener directamente de una célula hospedadora u organismo que produzca el anticuerpo (por ejemplo, la composición puede comprender el fluido del cultivo celular cosechado).

15

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido es una proteína de mamífero, los ejemplos de las cuales incluyen: renina, una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas; alfa-1- antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del foliculo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores coagulantes tales como el factor VIIIIC, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como la proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético, factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada en la activación, normalmente expresada de los linfocitos T y secretada); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1- alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora Muleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina murina; una proteína microbiana, tal como beta lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β; factor derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento similar a insulina-I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina, factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogénica de hueso (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de superficie de membrana; factores acelerantes de la degradación, antígenos virales tales como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas vehículos; receptores de adhesión; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumores tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, que se unen a cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados.

20

25

30

35

40

45

Un "contaminante" es un material que es distinto del producto polipeptídico deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula hospedadora, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada, ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado, isómero o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente de medios de cultivos celulares (por ejemplo, garamicina, GENTAMICINA®) etc.

50

Un polipéptido de interés en el presente documento es uno que comprende una región C_{H2}/C_{H3} y por lo tanto se puede someter a purificación por cromatografía de afinidad a proteína A. La expresión "región C_{H2}/C_{H3} " cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interacciona con la proteína A. En realizaciones preferentes, la región C_{H2}/C_{H3} comprende una región C_{H2} intacta seguida de una región C_{H3} intacta, y más preferentemente una región Fc de una inmunoglobulina. Los ejemplos de polipéptidos que contienen regiones C_{H2}/C_{H3} incluyen anticuerpos, inmunoadhesinas y proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de interés fusionado a, o conjugado con, una región C_{H2}/C_{H3} .

55

60

En realizaciones preferentes de la invención, el anticuerpo para purificar en el presente documento es un anticuerpo recombinante. Un "anticuerpo recombinante" es uno que se ha producido en una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado con el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o produce el anticuerpo como un resultado de la recombinación homóloga. "Transformación" y "transfección" se usan indistintamente para referirse al proceso de introducir ácido nucleico en una célula. Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula hospedadora, o puede existir como un elemento extracromosómico. La

65

"célula hospedadora" incluye una célula en cultivo celular *in vitro* así como una célula dentro de un animal hospedador. Los métodos para la producción recombinante de polipéptidos se describen en la patente de EE.UU. N° 5.534.615.

5 El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando retengan, o se modifiquen para comprender, una región C_H2/C_H3 como se define en el presente documento.

10 El anticuerpo del presente documento se dirige hacia un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido de importancia biológica y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolípidicos asociados a tumores; véase la patente de los EE.UU. 5.091.178). Cuando el antígeno es un polipéptido, este puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen
 15 los polipéptidos anteriormente analizados. Las dianas moleculares preferentes para los anticuerpos que abarca la presente invención incluyen polipéptidos CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de las familias del receptor HER tales como el receptor de EGF (HER1), HER2, HER3 o el receptor HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Macl, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y av/b3 integrina incluyendo bien las subunidades a o b de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de *mpl*; CTLA-4; polipéptido C etc. Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, se pueden usar como inmunógenos para generar anticuerpos. Se pueden usar como el inmunógeno para moléculas transmembrana, tales como receptores, fragmentos de los mismos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor). Como alternativa, se pueden usar como el inmunógeno las células que expresan
 20 la molécula transmembrana. Dichas células pueden proceder de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

30 Los ejemplos de anticuerpos para purificar en el siguiente documento incluyen, pero sin limitación: anticuerpos de HER2 incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992), Patente de EE.UU. N° 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO01/00245); anticuerpos para CD20 (véase posteriormente); anticuerpos de IL-8 (St John *et al.*, Chest, 103:932 (1993), y Publicación Internacional N° WO 95/23865); anticuerpos de VEGF o receptor de VEGF incluyendo anticuerpos de VEGF humanizados y/o madurados por afinidad tales como el anticuerpo de VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim *et al.*, Growth Factors, 7:53-64 (1992), Publicación Internacional N° WO 96/30046); y documento
 35 WO 98/45331, publicado el 15 de octubre, 1998); anticuerpos de PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos de CD11a incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (Patente de EE.UU. N° 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe *et al.*, Transplant Intl. 4:3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, Transplantation 58:377-380 (1994)); anticuerpos que se unen a IgE incluyendo omalizumab (XOLAIR®) (Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623-2632 (1993), y Publicación Internacional N° WO 95/19181; Patente de EE.UU. N° 5.714.338, expedida el 3 de febrero, 1998 o patente de los EE.UU. N° 5.091.313, expedida el 25 de febrero, 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo, 1993, o la Solicitud Internacional N° PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio, 1998, Patente de EE.UU. N° 5.714.338); anticuerpos de CD18 (Patente de EE.UU. N° 5.622.700, expedida el 22 de abril, 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio, 1997), anticuerpos para el anticuerpo del receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre,
 45 1998), Anticuerpos del factor tisular (TF) (Patente Europea N° 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre, 1994), anticuerpos de $\alpha_4\alpha_7$ integrina (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero, 1998), anticuerpos de EGFR (por ejemplo, el anticuerpo quimérico o humanizado 225, cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre, 1996), anticuerpos de CD3 tales como OKT3 (Patente de EE.UU. N° 4.515.893 expedida el 7 de mayo, 1985); anticuerpos de CD25 o Tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (Ver Patente de EE.UU. 5.693.762 expedida el 2 de diciembre, 1997); anticuerpos de CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos de CD25 tales como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann *et al.*, Nature 332:323-337 (1988)); anticuerpos del receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc (RI como en Graziano *et al.*, J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995)); anticuerpos del antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey *et al.*, Cancer Res. 55(23Supl): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra células
 50 epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, Cancer Res. 55(23 Sup): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton *et al.*, Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996)); anticuerpos de CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al.*, J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos de CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, Cancer Res 55(23 Supl):5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; Anticuerpos de EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos de Gp11b/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos de VSR tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos de CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos de VIH tales como PRO542; anticuerpos de la hepatitis tales como el anticuerpo de Hep B OSTAVIR®; anticuerpo de CA 125 OvaRex; anticuerpo idiotípico de epítipo GD3 BEC2; anticuerpo de $\alpha\beta_3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo de carcinoma de células renales humanas tal como ch-G250; ING-1; un anticuerpo 17-1 anti-humano (3622W94); anticuerpo de tumor colorrectal anti-humano (A33); anticuerpo de melanoma anti-humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpo de carcinoma de células escamosas anti-humano (SF-25); anticuerpo de antígeno leucocitario humano

(HLA) tal como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo de CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo de IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti-linfocitos B (Impheron); anticuerpo AcMo dirigido a linfocitos B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo de Lym-1, tal como Lym-1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo de BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo del receptor de BAFF (véase por ejemplo, documento WO 02/24909); anticuerpo de BR3, anticuerpo de Blys tal como belimumab; LYMPHOSTAT -B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticuerpo del receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo de IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo del receptor de quimiocinas, tal como un anticuerpo de CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millienneum); anticuerpo anti-complemento, tal como el anticuerpo de C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo de IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticuerpos de CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpos de TNF- α incluyendo cA2 o infliximab (REMI-CADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), fragmento de anticuerpo de TNF- α pegilado tal como CDP-870 (Cell-tech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (por ejemplo, PassTNF; Verigen); anticuerpos de CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 y epratuzumab I-131, anticuerpo de CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH), y LympoScan Tc99 (Immunomedics).

Los ejemplos de anticuerpos de CD20 incluyen: "C2B8," que actualmente se denomina "rituximab" ("RITUXAN®") (Patente de EE.UU. 5.736.137); el anticuerpo 2B8 marcado con itrio-[90] murino designado como "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) comercialmente disponible en IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Patente de EE.UU. N° 5.736.137; 2B8 depositado en la ATCC con el n° de referencia HB11388 el 22 de junio, 1993), IgG2a murino "B1", también denominado "Tositumomab," opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "tositumomab de yodo I131" (BEXXAR™) comercialmente disponible en Corixa (véase, también, Patente de EE.UU. N° 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, Blood 69(2):584-591 (1987)) y variantes del mismo que incluyen 1F5 "de marco parcheado" o humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC depósito HB-96450); 2H7 murino y anticuerpo 2H7 quimérico (Patente de EE.UU. 5.677.180); 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *et al.*); 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo completamente humano, de alta afinidad dirigido a la molécula de CD20 en la membrana celular de los linfocitos B (Genmab, Dinamarca; ver, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003) y Cragg *et al.*, Blood 101: 1045-1052 (2003); documentos WO 2004/035607; US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en los documentos WO 2004/035607 y US2004/0167319 (Teeling *et al.*); los anticuerpos que tienen cadenas de azúcares unidas con N glucósido complejas unidas a la región Fc descrita en el documento US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*) tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25 y MB20-11; moléculas de unión a CD20 tales como la serie de anticuerpos AME, por ejemplo, los anticuerpos AME 33 como se expone en los documentos WO 2004/103404 y US2004/0025764 (Teeling *et al.*; Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas de unión a CD20 tales como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); anticuerpo A20 o variantes de los mismos tales como anticuerpo A20 humanizado o quimérico (cA20, hA20, respectivamente) o IMMU-106 (documento US 2003/0219433, Immunomedics); anticuerpos de unión a CD-20, incluyendo el Lieu-16 agotado de epítomos, 1H4, o 2B8, opcionalmente conjugado con IL-2, tal como en los documentos US 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr *et al.*); anticuerpo biespecífico que se une a CD22 y CD20, por ejemplo, hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang *et al.*); anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del Taller Internacional de Tipado de Leucocitos (Valentine *et al.*, En: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., página 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.*, Blood 92:184 (1998)); conjugado anti-CD20 auristatina E (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Bi-ovation/City of Hope); terapia con MAb anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion).

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como aquel que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden llevarse a cabo por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), o puede llevarse a cabo por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4.816.567) En una realización adicional, los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy extensas (Waterhouse *et al.*, Nuc.

Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Como alternativa, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. Transferir la matriz génica de la línea germinal de la inmunoglobulina humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Brug-germann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature 355:258 (1992).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (Inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con respecto a u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) con respecto a u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Polypeptides of Immunological Interest, 5ª edición, Servicio de salud pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los restos "de marco conservado" o "FR" son los restos del dominio variable que no son restos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen las mínimas secuencias procedentes de la inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región de marco conservado (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para el uso en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. Después se acepta la secuencia humana que es más cercana a la del roedor como el marco conservado humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)).

Otro método usa un marco conservado particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco conservado para algunos de los distintos anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Es más importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un método preferente, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales que usan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y muestran las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el

análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor e importarse las secuencias de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como aumento de la afinidad por el/los antígeno(s) diana. En general, los restos de las CDR se involucran directamente y más sustancialmente en influir en la unión a antígeno.

5 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la de unión a antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado diversas técnicas para la
10 producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron de anticuerpos intactos por medio de digestión proteolítica (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos actualmente se pueden producir directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos anteriormente analizadas. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*,
15 Bio/Technology 10:163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, Los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante experto en la materia.

20 En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión con el antígeno. Para una revisión de los sFv ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal
25 Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

30 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen de un modo más completo en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl.
35 Acad. Sci, EE.UU. 90:6444-6448 (1993).

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

45 Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos distintos, donde los epítopos son habitualmente de distintos antígenos. Mientras que dichas moléculas normalmente se unirán solamente con dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcBis), esta expresión engloba anticuerpos con especificidades adicionales tales como los anticuerpos triespecíficos cuando se usa en el presente documento. Los ejemplos de AcBis incluyen los que tienen un brazo dirigido contra un antígeno de células tumorales y el otro brazo dirigido contra una molécula citotóxica accionadora tales como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-
50 molécula de adhesión de células neurales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a pan-carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; AcBis con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena de ricina A, anti-interferón-α(IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcaloide de la vinca; AcBis para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); AcBis que se pueden usar como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador del plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA); AcBis para dirigir complejos inmunes a receptores de superficie celular tales como las lipoproteínas de baja densidad (LDL)/anti-receptor Fc (por ejemplo, FcγRI, o FcγRIII); AcBis para el uso en terapias de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (VHS), anti-receptor de linfocitos T: complejo CD3/anti-gripe, anti-FcγR/anti-VIH; AcBis para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; AcBis como adyuvantes de vacunas; y AcBis como herramientas diagnósticas tales como IgG anti-conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se
65 pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos

biespecíficos F(ab')₂.

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

5 Un "anticuerpo desnudo" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o radiomarcaje.

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

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas y preventivas. Los que necesiten el tratamiento, incluye a los que ya tienen el trastorno así como a en los que el trastorno ha de prevenirse.

15 Un "trastorno" es cualquier afección que pueda beneficiarse del tratamiento con el anticuerpo que se purifica como se describe en el presente documento. Esto incluye trastornos y enfermedades tanto crónicos como agudos y los estados patológicos que predisponen al mamífero para el trastorno en cuestión.

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

25 Una membrana de cromatografía de intercambio iónico se unirá a un compuesto con una carga total positiva o negativa. Los sitios de unión se localizan a lo largo de los poros del adsorbente. El compuesto se transporta al sitio de unión por convección. Una membrana cargada positivamente (intercambiador aniónico) se unirá a un compuesto con una carga total negativa. A la inversa, Una membrana cargada negativamente (intercambiador catiónico) se unirá a un compuesto con una carga total positiva.

30 Las membranas de intercambio iónico pueden clasificarse además bien como fuertes o débiles. Las membranas de intercambio iónico fuertes están cargadas (ionizadas) a lo largo de un intervalo amplio de niveles de pH. Las membranas de intercambio iónico débiles se ionizan dentro de un intervalo de pH estrecho. Las cuatro químicas de intercambio iónico más comunes son:

Tipo de intercambio	Abreviatura común	Grupo funcional
Anión Fuerte	Q	Amonio cuaternario
Anión débil	D	Dietilamina
Catión fuerte	S	Ácido sulfónico
Catión débil	C	Ácido carboxílico

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

45 Una puntuación del tamaño de poro "nominal" describe la capacidad de la membrana de retener la mayoría de las partículas del 60 % al 98 % del tamaño de poro puntuado.

50 El "pH" de una solución mide la acidez o alcalinidad respecto de la ionización de una muestra de agua. El pH del agua es neutro, es decir, 7. La mayor parte de las lecturas de pH varían de 0 a 14. Las soluciones con una [H⁺] mayor que el agua (pH menor que 7) son ácidas; las soluciones con una [H⁺] menor que el agua (pH mayor que 7) son básicas o alcalinas; El pH se puede medir usando un medidor de pH. El pH del tampón se puede ajustar usando un ácido o una base como HCl o NaOH.

55 El "pI" o "punto isoeléctrico" de una molécula tal como un polipéptido se refiere al pH al cual el polipéptido contiene un igual número de cargas positivas y negativas. El pI se puede calcular a partir de la carga neta de los restos de aminoácidos del polipéptido o se puede determinar por isoelectroenfoque. Se puede manipular la naturaleza anfótera de los polipéptidos para tener tanto grupos aniónicos como catiónicos. El pH de un polipéptido se puede bajar hasta el punto donde el polipéptido deseado de comporta como un catión (tiene una carga positiva). Como alternativa, el pH

de un polipéptido se puede aumentar hasta el punto donde el polipéptido deseado se comporta como un anión (tiene una carga negativa).

5 El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. La unidad básica de la conductividad es el siemens (S), originalmente denominado mho. La conductividad se expresa comúnmente en unidades de mS/cm. Dado que la carga de los iones en solución facilita la conductancia de la corriente eléctrica, la conductividad de una solución es proporcional a su concentración de iones. Ambas de estas mediciones se correlacionan bien con la fuerza iónica. La fuerza iónica se relaciona estrechamente con la concentración de electrolitos e indica lo eficazmente que la carga de un ión particular se apantalla o estabiliza por otros iones en un electrolito. La principal diferencia entre la fuerza iónica y la concentración de electrolitos es que la primera es mayor si algunos de los iones tienen una carga mayor. Otra diferencia entre las dos es que la fuerza iónica refleja la concentración de los iones libres, y no solamente cuánta sal se añade a la disolución. La conductividad se puede medir usando un medidor de conductividad, tal como diversos modelos de medidores de conductividad Orion. La conductividad de una solución se puede alterar cambiando la concentración de los iones de la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponador y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro sódico, acetato sódico o cloruro potásico) en la solución se puede alterar a fin de alcanzar la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sales de los diversos tampones se modifica para alcanzar la conductividad deseada.

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

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

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

30 Por "purificar" un anticuerpo de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes se entiende el aumentar el grado de pureza del anticuerpo de la composición eliminando (completamente o parcialmente) al menos un contaminante de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso total de purificación que da como resultado una composición "homogénea". En el presente documento se usa "homogénea" para referirse a una composición que comprende al menos el 70 % en peso del anticuerpo de interés, basándose en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente el 80 % en peso, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % en peso, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 95% en peso.

40 Por "unir" una molécula a una membrana de intercambio iónico se entiende exponer la molécula a la membrana de intercambio iónico en condiciones apropiadas (pH y/o conductividad) tales que la molécula se inmovilice de forma reversible en o sobre la membrana de intercambio iónico en virtud de las interacciones electrostáticas entre la molécula y un grupo cargado o grupos cargados de la membrana de intercambio iónico.

45 Por "lavar" la membrana de intercambio iónico se entiende pasar un tampón apropiado a través o a lo largo de la membrana de intercambio iónico.

Por "eluir" una molécula (por ejemplo, anticuerpo o contaminante) de una membrana de intercambio iónico se entiende eliminar la molécula de la misma.

50 Para la cromatografía de membrana, "flujo continuo" se refiere a unir las impurezas a la membrana mientras el compuesto no se retiene.

55 La frase "modo mixto" se refiere a un sorbente que tiene la capacidad de separar compuestos basándose en dos mecanismos distintos, por ejemplo una separación basada en las diferencias de hidrofiliidad/hidrofobicidad entre polipéptidos superpuestos en una separación basándose en la carga neta. Esto se lleva a cabo a menudo usando un ligando multimodal que pueda interactuar con una molécula diana de varias maneras distintas incluyendo la interacción iónica y los enlaces de hidrógeno o interacción hidrófoba. Los sorbentes como Capto™ MMC y Capto™ Adhere de GE Healthcare son ejemplos de resinas de cromatografía de "modo mixto".

60 Modos de llevar a cabo la invención

65 Se describen en el presente documento métodos para purificar un anticuerpo monoclonal a partir de una composición (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende el anticuerpo monoclonal y uno o más contaminantes. La composición es generalmente una resultante de la producción recombinante del anticuerpo monoclonal, pero puede resultar de la producción del anticuerpo monoclonal por síntesis peptídica (u otro medio sintético) o el anticuerpo monoclonal se puede purificar a partir de una fuente nativa del polipéptido.

Producción recombinante de anticuerpos

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico codificante se aísla y se inserta en un vector replicable para el clonaje posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se
 5 aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Existen numerosos vectores disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción (por ejemplo, tal como se
 10 describe en la Patente de EE.UU. 5.534.615).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son procariontas, levaduras o células eucarióticas superiores. Las procariontas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*,
 15 por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril, 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonaje preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), a pesar de que otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.

Además de las procariontas, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonaje o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. La *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, es la que se usa más comúnmente entre los microorganismos eucarióticos inferiores
 25 hospedadores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* and *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados proceden de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado
 35 numerosas cepas de baculovirus y variantes y las células hospedadoras de insectos permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Diversas cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 del VPN de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del VPN de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente
 40 invención, particularmente para la transfección de las células de *Spodoptera frugiperda*. Células vegetales de cultivos de algodón, maíz, patata, semilla de soja, petunia, tomate, y tabaco también se pueden utilizar como hospedadores.

Sin embargo, el interés más grande ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras
 45 de mamíferos útiles incluyen, pero sin limitación, células de riñón de mono CV1 transformadas con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células embrionarias humanas de riñón (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:68514216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello
 50 uterino humanas (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)), células MRC 5; células FS4; y células humanas de hepatoma (Hep G2). A menudo, se prefieren las células CHO para la expresión de anticuerpos, y pueden usarse ventajosamente para producir los anticuerpos purificados de acuerdo con la presente invención.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la
 60 producción de anticuerpos y se cultivan en medios modificados con los nutrientes convencionales de modo apropiado para inducir los promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes para codificar las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras que se usan para producir los anticuerpos de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como el de Ham F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) están disponibles para cultivar
 65 las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o

5.122.469: documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Referencia Patente de EE.UU. 30.985 se puede usar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES),
 5 nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como garamicina; GENTAMICINA®), elementos traza (que se definen como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro de los complementos necesarios se puede incluir también a concentraciones apropiadas que podrían ser conocidas para los expertos en la materia. Las
 10 condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH, y similares, son las que se han usado previamente para la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la materia.

15 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los residuos particulados, bien de las células hospedadoras o células lisadas (por ejemplo, resultantes de la homogeneización), por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión pueden concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

20 El método de cromatografía de intercambio iónico de membrana de la invención

25 En la realización preferente de la invención, la composición que va a someterse al método de purificación del presente documento es un anticuerpo producido de modo recombinante, preferentemente un anticuerpo intacto, expresado por un cultivo de células hospedadoras recombinantes de ovario de hámster chino (CHO). Opcionalmente, la composición se somete a al menos una etapa de purificación previa a la cromatografía de intercambio iónico de membrana. La
 30 composición contiene el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada, ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente de medios de cultivos celulares (por ejemplo, garamicina; GENTAMICINA®), etc.

35 Los ejemplos de procedimientos de purificación adicionales que se pueden realizar antes de, durante, o después del método de cromatografía de intercambio iónico de membrana incluyen el fraccionamiento en una cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, en FENIL-SEPHAROSE™), precipitación con etanol, precipitación térmica, precipitación con polietilenglicol (PEG), isoelectroenfoque, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en HEPARINA SEPHAROSE™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio
 40 catiónico, intercambio iónico en modo mixto, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de inducción de carga hidrófoba, filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF), y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A, proteína G, un anticuerpo, o un sustrato específico, ligando o antígeno como el reactivo de captura).

45 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los residuos particulados, bien de las células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o filtración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, las células hospedadoras recombinantes se pueden separar del medio de cultivo, por ejemplo por centrifugación o filtración.

50 La mayor parte de la purificación ocurre durante la cromatografía de afinidad de proteína A. La proteína A es una proteína de la pared celular bacteriana que se une específicamente a la región Fc de los anticuerpos. Cuando se inmoviliza en medios cromatográficos, la proteína A proporciona una técnica para purificar anticuerpos recombinantes debido a que se puede unir selectivamente a anticuerpos en soluciones complejas, permitiendo que las impurezas fluyan a través.

55 El protocolo básico de la columna de afinidad de proteína A es sencillo: unir a pH aproximadamente neutro y eluir a pH ácido. La proteína A inmovilizada en un soporte sólido se usa para purificar el polipéptido que contiene la región C_{H2}/C_{H3}. La fase sólida es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio, sílice o agarosa para inmovilizar la proteína A. Preferentemente, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado, columna de ácido silícico, o una columna de agarosa altamente reticulada. Una columna Mabsselect SuRe™, disponible en el mercado de GE Healthcare, es un ejemplo de una columna de una proteína A de agarosa altamente reticulada eficaz en la purificación de anticuerpos. Algunas veces, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica a la columna. La columna PROSEP A™, disponible en el mercado de
 60 Millipore Corporation, es un ejemplo de una columna de vidrio de poro controlado de proteína A que está recubierta con glicerol. La fase sólida para equilibrar la cromatografía de proteína A se equilibra con un tampón adecuado.

65 La preparación contaminada procedente de las células hospedadoras recombinantes se carga en la fase sólida equilibrada usando un tampón de carga que debe ser el mismo que el tampón de equilibrio. A medida que la preparación contaminada fluye a través de la fase sólida, el polipéptido se adsorbe a la proteína A inmovilizada, y otros contaminantes (tales como las proteínas de ovario de hámster chino, CHOP, donde el polipéptido se produce en una

célula CHO) se unen no específicamente a la fase sólida.

La siguiente etapa realizada secuencialmente conlleva la eliminación de los contaminantes unidos a la fase sólida lavando con una solución que contiene una sal, aminoácido y/o disolvente de electrolito hidrófobo en una etapa intermedia de lavado. En realizaciones preferentes, la sal de este lavado es fosfato de potasio, el aminoácido es la arginina, y el electrolito hidrófobo es TEMAC y/o TEAC. Mientras que un único soluto puede estar presente en el lavado, en ciertas realizaciones, se pueden usar dos o más solutos. El/los soluto(s) se añaden preferentemente a una solución de pH tamponado que tenga un pH que se aproxima a la neutralidad.

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

La cromatografía de membrana de intercambio iónico se realiza como se reivindica en el presente documento. Primero se toma la decisión de si se va a emplear una membrana de intercambio aniónico o catiónico. A pesar de que el punto isoeléctrico (pI) de algunos anticuerpos varíe de aproximadamente 6,7 a 9,4, el pI de muchos anticuerpos es alto (habitualmente >8 y algunas veces >9). En general, se puede usar una membrana de intercambio catiónico para anticuerpos con pI mayores de aproximadamente 8, y se puede usar una membrana de intercambio aniónico para anticuerpos con pI menores de aproximadamente 8.

Para la ejecución de la cromatografía de intercambio catiónico de membrana en modo de desplazamiento de proteína indígena, el pH del material de carga se ajusta de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 40 mS/cm, dependiendo del pH, y después se bombea el anticuerpo a través de la membrana. En algunas realizaciones, el pH del material de carga se ajusta de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH, o aproximadamente 1 unidad de pH, por debajo del pI del anticuerpo. En otras realizaciones, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 20 mS/cm o \leq aproximadamente 10 mS/cm, dependiendo del pH. Debido a que el pH de la carga es menor que el pI del anticuerpo, el anticuerpo (que se ha cargado positivamente) NO fluirá a través inicialmente. Más bien, el anticuerpo se unirá electrostáticamente a los grupos funcionales negativos del intercambiador de cationes. Esto se debe a que el anticuerpo (positivo) y la membrana (negativa) tienen carga opuesta. Dado que el pI de muchos de los contaminantes, por ejemplo, proteínas de la célula hospedadora, tales como CHOP, que eluyen con el anticuerpo durante la cromatografía de afinidad de proteína A es solamente ligeramente distinto del pI del anticuerpo, es decir, el pI puede diferir en solamente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 unidades del pI, estos contaminantes, como los anticuerpos "básicos", también se unirán a la membrana. Sin estar ligados por la teoría, parece que para la ejecución de la cromatografía de intercambio catiónico de membrana en modo de desplazamiento de proteína indígena, a condiciones de pH y conductividad que induzcan la carga con apantallamiento iónico mínimo, los contaminantes preferentemente se unen a la membrana, o de otro modo "desplazan" eficazmente el anticuerpo de la membrana (RR Drager, FE Regnier, J Chromatogr. 359:147-55 (1986)), permitiendo que el anticuerpo se "eluya" de la matriz o fluya a través después de la unión y se pueda recuperar en el efluente.

Para la ejecución de la cromatografía de intercambio aniónico de membrana en modo de desplazamiento de proteína indígena, el pH del material de carga se ajusta de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 40 mS/cm, dependiendo del pH, y después se bombea el anticuerpo a través de la membrana. En algunas realizaciones, el pH del material de carga se ajusta de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH, o aproximadamente 1 unidad de pH, por encima del pI del anticuerpo. En otras realizaciones, la conductividad del material de carga se ajusta a \leq aproximadamente 20 mS/cm o \leq aproximadamente 10 mS/cm, dependiendo del pH. Debido a que el pH de la carga es mayor que el pI del anticuerpo, el anticuerpo (que se ha cargado negativamente) NO fluirá a través inicialmente. Más bien, el anticuerpo se unirá electrostáticamente a los grupos funcionales positivos del intercambiador aniónico. Esto se debe a que el anticuerpo (negativo) y la membrana (positiva) tienen carga opuesta. Dado que el pI de muchos de los contaminantes, por ejemplo, proteínas de la célula hospedadora, tales como CHOP, que eluyen con el anticuerpo durante la cromatografía de afinidad a proteína A es solamente ligeramente distinto del pI del anticuerpo, es decir, los pI puede diferir en solamente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 unidades del pI, estos contaminantes, como los anticuerpos "ácidos", también se unirán a la membrana. Sin estar ligados por la teoría, parece que para la ejecución de la cromatografía de intercambio aniónico de membrana en modo de desplazamiento de proteína indígena, a condiciones de pH y conductividad que induzcan la carga con apantallamiento iónico mínimo, los contaminantes preferentemente se unen a la membrana, o de otro modo "desplazan" eficazmente el anticuerpo de la membrana (RR Drager, FE Regnier, J Chromatogr. 359:147-55 (1986)), permitiendo que el anticuerpo se "eluya" de la matriz o fluya a través después de la unión y se pueda recuperar en el efluente.

En un ejemplo, la cromatografía de membrana se ejecuta bien en un sistema convencional de cromatografía o en un

sistema de cromatografía personalizado como un AKTA™ Explorer (GE Healthcare) equipado con medidores de presión, sensores, bomba junto con los controles de la bomba. En este ejemplo, el dispositivo se instala corriente abajo de un medidor de presión. En dicho ejemplo, los detectores de pH y conductividad se instalan corriente abajo del dispositivo de membrana. Continuando con este ejemplo, este sistema se lava exhaustivamente con agua y después con tampón de equilibrio antes de la instalación de la membrana. Continuando más con el ejemplo, el sistema con la membrana se lava con tampón de equilibrio hasta que el pH de la solución y la salida de conductividad coinciden con la especificación del tampón de equilibrio (aproximadamente cinco volúmenes de membrana) y se observa una línea basal estable. Continuando aún más con este ejemplo, el material de alimentación se carga por una bomba a 333 - 2667 VM/h, pH 5,5 (para la purificación de un anticuerpo "básico" hipotético) o pH 8,0 (para la purificación de un anticuerpo "ácido" hipotético), y una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm. Continuando aún más con este ejemplo, se registran la contrapresión operativa, y los cambios en el pH y la conductividad durante la operación. Finalmente, en este ejemplo, el polipéptido del efluente de la membrana se recoge inmediatamente cuando una traza de absorbancia ultravioleta (UV) a 280 nm es de 0,2 unidades de absorbancia por encima de la línea basal, el conjunto de recogida para una vez que la traza UV a 280 nm está por debajo de 0,2 unidades de absorbancia, y las muestras del conjunto en la fracción del efluente de la membrana se ensayan con respecto a la concentración del polipéptido, nivel de dimerización/agregación, proteínas de la célula hospedadora, ADN, y proteína A lixiviada. La etapa de recuperación se calcula normalmente usando el polipéptido que se carga y el polipéptido del efluente de la membrana. Tradicionalmente, la membrana se usa una sola vez.

En cuanto a los ensayos analíticos, el contenido de polipéptido (concentración de anticuerpo) se puede determinar por absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro Beckman. La agregación del anticuerpo se puede determinar por cromatografía de exclusión por tamaño. Los niveles de proteínas de la célula hospedadora, por ejemplo, CHOP, se pueden analizar por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). El ADN de la célula hospedadora se puede cuantificar empleando la PCR TaqMAN (reacción en cadena de la polimerasa). La proteína A lixiviada se puede realizar usando el método inmunoquímico basado en ELISA recomendado por el proveedor de la resina de proteína A.

Los siguientes tampones están hipotéticamente diseñados y ensayados para el uso con la membrana S: (1) ácido acético 89 mM, base Tris 127 mM pH 7,5, ácido cítrico 21 mM, pH 5,5, 6,0 mS/cm, (2) MES 28 mM, NaCl 95 mM, pH 6,0, 11 mS/cm, (3) NaOAc 200 mM, pH 5,5, 12 mS/cm, (4) NaOAc 100 mM, pH 5,5, 6,4 mS/cm, y (5) ácido acético 96 mM, Tris 65 mM, pH 5,0, 3,6 mS/cm,

Los siguientes tampones están hipotéticamente diseñados y ensayados para el uso con la membrana Q: (1) TRIS 50 mM, NaCl 15 mM, pH 8,0, 4,3 mS/cm, (2) TRIS 25 mM, pH 8,0, 1,3 mS/cm, (3) TRIS 60 mM, NaCl 118 mM, pH 8,0, 15,7 mS/cm, (4) TRIS 50 mM, NaOAc 50 mM, pH 8,0, 7,0 mS/cm, (5) HEPES 25 mM, NaOAc 85 mM, pH 7,0, 6,5 mS/cm, y (6) ácido acético 91 mM, TRIS 130 mM, pH 8,0, 5,0 mS/cm,

Adicionalmente, el pH de cualquier sistema tamponador se puede ajustar positiva o negativamente con la adición de ácido acético, ácido cítrico, HEPES, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, hidróxido de sodio, TRIS, u otros de dichos tampones ácidos y básicos para alcanzar un pH adecuado. La conductividad de cualquier sistema tamponador se puede ajustar también positiva o negativamente usando agua purificada, agua para inyección (WFI), acetato de sodio, cloruro sódico, fosfato de potasio, u otros de dichos tampones con bajo y alto contenido en sales para alcanzar una conductividad adecuada.

El desarrollo de la etapa de cromatografía de membrana de desplazamiento de la proteína indígena es sencillo. El material de carga corre a través de la membrana a varios niveles de pH y conductividad. La retención del polipéptido, bien anticuerpo o contaminante, se puede potenciar cuando la molécula tiene una gran interacción electrostática. Las interacciones electrostáticas se pueden potenciar cuando se actúa en condiciones en las que los polipéptidos están muy cargados, es decir, cuando se usa un tampón que tenga un pH suficientemente distinto del pI del polipéptido, potenciando la carga del polipéptido, y una fuerza iónica baja para prevenir el apantallamiento de cargas por iones del tampón. Por el contrario, las interacciones electrostáticas se pueden reducir cuando se actúan en condiciones en las que los polipéptidos están poco cargados, es decir, cuando se usa un tampón que tenga un pH suficientemente cercano al pI del polipéptido, reduciendo la carga del polipéptido, y una fuerza iónica alta para permitir el apantallamiento de cargas por iones del tampón. Como resultado, los polipéptidos que tienen distintas propiedades fisicoquímicas se pueden separar por adsorción a la membrana optimizando la solución de tampón. Algunas moléculas se pueden retener en una membrana dada mientras que otras fluirán a través de esta basándose en la selección apropiada del pH y la fuerza iónica del tampón.

La preparación de anticuerpos obtenida de acuerdo con el método de la cromatografía de intercambio iónico de membrana en el presente documento puede someterse a etapas adicionales de purificación, si es necesario. Se han analizado anteriormente etapas adicionales ejemplares.

Citando la Figura 12, un ejemplo de esquema de una purificación exitosa es un proceso de recuperación que conlleva una etapa de fraccionamiento inicial de cromatografía de afinidad de proteína A, una etapa de purificación intermedia de cromatografía de intercambio catiónico ejecutada en modo unión/elución, y una etapa final de limpieza de cromatografía de intercambio aniónico en un modo de flujo continuo.

Citando la Figura 13, un ejemplo de esquema de purificación mejorada es un proceso de recuperación que conlleva la etapa inicial de fraccionamiento de cromatografía de afinidad a proteína A pero reemplazando la ejecución de la cromatografía de columna de intercambio catiónico en modo unión/elución por una ejecución de membrana de intercambio catiónico en modo de desplazamiento de la proteína indígena. Esto podría ser ventajoso por muchos motivos, un motivo es que las etapas intermedia y de limpieza podrían combinarse en una operación continua, es decir, una única etapa.

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

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

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas de distribución de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o alcohol polivinílico), poliláctidos (Patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitubúrico.

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

El/los siguientes ejemplo(s) se ofrecen a modo ilustrativo y no a modo de limitación.

Ejemplos

Introducción

Los títulos de los biorreactores para anticuerpos monoclonales (AcMo) están aumentando a medida que mejoran las condiciones de los cultivos celulares. Los lotes mayores de AcMo pueden ser difíciles de purificar usando la cromatografía en columna tradicional. Las nuevas resinas con capacidades de unión aumentadas pueden no ser suficientes para evitar la necesidad de ciclos o ejecuciones de múltiples columnas en paralelo. La falta de capacidad para manejar lotes mayores podría suponer un impacto negativo en los costes de los materiales y la capacidad de la planta. Adicionalmente, la industria del bioprocesamiento necesita herramientas más convenientes y rentables a fin de reducir el coste de los materiales. Son deseables tecnologías de purificación pequeñas y desechables que puedan reducir simultáneamente los costes de validación y trabajo. A medida que evoluciona la industria, las membranas de

intercambio iónico pueden llegar a ser cada vez más ventajosas para el procesamiento de AcMo.

Aunque los métodos de cromatografía en columna son robustos y fiables, por lo general, tienen una baja producción de masas ya que el rendimiento de separación depende de la difusión en el poro. Los productos y las impurezas deben difundirse lentamente en los poros para acceder a sitios de unión. Por el contrario, las membranas están limitadas por la difusión del poro. El rendimiento de separación es independiente del caudal y por lo tanto las membranas pueden tener producciones de masa mucho más altas comparadas con las resinas. Las membranas también son más convenientes que las resinas, ya que no requieren cuerpos de columnas, empaquetado/desempaquetado de columnas, o cualificación. Están disponibles membranas a escala industrial en formatos de cartuchos o auto-encapsulados que pueden desecharse después de un solo uso, eliminando además los costes de validación asociados con la reutilización y el almacenamiento. Las membranas también son más pequeñas y significativamente más ligeras que las columnas rellenas con resinas, lo que facilita el manejo sin una instalación de fabricación.

Las membranas tienen algunos inconvenientes. En comparación con las resinas son una tecnología relativamente nueva que aún no ha experimentado la integración generalizada a escala industrial. Los tipos de membranas disponibles en el mercado y la selección de ligandos bien caracterizados son limitados. Las membranas también son significativamente más caras que las resinas de intercambio iónico. Adicionalmente, no son un medio óptimo para realizar la cromatografía de unión y elución a escala industrial. Las membranas tienen capacidades de unión relativamente bajas que son difíciles de compensar de un modo económico a través de ciclos. La mayoría de estos problemas se resolverán probablemente a medida que se desarrollen membranas de nueva generación.

A pesar de los inconvenientes, las membranas han establecido un nicho en la purificación corriente abajo. Las membranas de intercambio iónico se han probado con éxito como etapa consecutiva a la captura de AcMo con proteína A. Las membranas son ideales en esta posición debido a que los niveles de impurezas son bajos y, que cuando se usan en modo de flujo continuo, la capacidad de unión ya no es limitante. La cromatografía de flujo continuo se define como una operación cromatográfica donde la proteína diana fluye a través del medio sorbente sin unirse mientras que las impurezas cargadas apropiadamente se adsorben. Extendida a la cromatografía de membrana, es una técnica que aprovecha una fuerza repulsiva que se establece entre la membrana y el AcMo de modo que la mayor parte de los sitios de unión permanece disponible para la adsorción de las especies CHOP con carga opuesta.

Este estudio se centra en la purificación de anticuerpos monoclonales usando membranas de intercambio iónico en modo de desplazamiento de proteína indígena. El enfoque difiere del flujo continuo porque el AcMo se procesa a lo largo de la membrana a condiciones de pH y conductividad que causan la adsorción del producto. Esto se lleva a cabo operando a fuerza iónica baja y a pH por encima del pI del anticuerpo durante intercambio aniónico, y por debajo del pI del AcMo durante el intercambio catiónico. En estas condiciones, se establece una fuerza de atracción entre la membrana y los AcMo que da como resultado la adsorción del producto. La carga del flujo de alimentación continúa más allá de la capacidad de ruptura y el efluente de la membrana se recoge en una forma purificada. Los datos experimentales para el modo de desplazamiento de proteína indígena muestran purificación y rendimiento altos, que no fueron obvios dada la fuerte interacción entre la membrana y los AcMo.

Se seleccionaron cuatro ADN recombinantes procedentes de AcMos para el análisis basándose en los intervalos de sus puntos isoeléctricos (pI 6,7 – 9,3, calculados basándose en la secuencia de aminoácidos). Se produjeron los cuatro AcMos en cultivos de células CHO en Genentech Inc. y se purificaron parcialmente con una o más etapas de cromatografía en columna (proteína A o proteína A e intercambio iónico). Se eligieron los flujos de alimentación basándose en los niveles residuales de proteínas de ovario de hámster chino (CHOP).

Este estudio explora la capacidad de las membranas de intercambio iónico Mustang™ S, Mustang™ Q, y Sartobind™ S para aclarar las CHOP a condiciones de pH y conductividad que también causen la adsorción de AcMo. La purificación de CHOP y el rendimiento se investigaron como una función del pH, conductividad, densidad de carga, caudal y tipo de membrana. También se estudiaron ampliación y regeneración de la membrana como una función del pH, conductividad, densidad de carga, velocidad de flujo y tipo de membrana. También se estudiaron la ampliación y regeneración de la membrana, y se exploró la viabilidad del proceso continuo.

Materiales y métodos

Flujo de alimentación

Los flujos de alimentación se tomaron a partir de lotes de cultivos celulares industriales, piloto, o a pequeña escala (Genentech Inc., San Francisco sur, California) inicialmente producidos para fines comerciales o de investigación. Cada flujo de alimentación se purificó parcialmente, lo que significa que las células se separaron y se purificó el fluido clarificado a lo largo de al menos una etapa de cromatografía de columna (proteína A o proteína A e intercambio iónico). Cada flujo de alimentación contenía un anticuerpo monoclonal terapéutico diana (IgG1 o IgG4) y un nivel cuantificable de impurezas de las células hospedadoras. La composición de cada flujo de alimentación varió dependiendo del proceso del AcMo individual y nivel de purificación. En general, el pH del flujo de alimentación fue de 5.5 - 8,0, la conductividad fue de 3,2 - 9,0 mS/cm, y la concentración del producto fue de 3,5 – 6,9 mg/ml. La tabla 1 muestra las características del flujo de alimentación para cada uno de los AcMo que se usan en este estudio.

Cuantificación de los AcMo

La concentración de AcMo se determinó usando un escaneo espectrofotométrico UV a 280 y 320 nm. Los niveles de CHOP fueron demasiado bajos para tener un efecto apreciable en la absorbancia de UV. Las muestras que contenían AcMo se diluyeron con diluyentes no interferentes apropiados en el intervalo de 0,1 a 1,0 UA. La preparación de las muestras y las lecturas del escaneo espectrofotométrico se realizaron por duplicado y se registró el valor medio. El coeficiente de absorción para los AcMo ensayados fue $1,45 - 1,70 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La absorbancia a 280 y 320 nm, factor de dilución, distancia de paso (1 cm), y coeficiente de absorción se usaron para calcular la concentración del AcMo usando la ecuación conocida como la Ley de Beer-Lambert.

$$\text{Concentración de Proteínas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{280} - A_{320}}{\text{Coef. de abs.}} \times \text{factor de dilución}$$

Cuantificación de las proteínas de las células hospedadoras CHO (CHOP)

Se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para cuantificar los niveles de CHOP. Los anticuerpos anti-CHOP de cabra purificados por afinidad se inmovilizaron en los pocillos de una placa de microtitulación. Las diluciones de las muestras que contenían CHOP, patrones y controles, se incubaron en los pocillos, seguido de la incubación con anticuerpos anti-CHOP de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se detectó con diclorhidrato de o-fenilendiamina. Las CHOP se cuantificaron midiendo la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de microtitulación. Se usó un programa informático de ajuste de curvas para generar la curva patrón y calcular automáticamente la concentración de la muestra. El intervalo de ensayo para el ELISA fue normalmente de 5 ng/ml a 320 ng/ml. Para cada muestra, se ensayaron 2-4 diluciones y se tomó la media de los valores. Los valores de CHOP se dividieron por la concentración de AcMo y los resultados se notificaron en unidades ppm (ng CHOP/mg AcMo).

Las muestras de filtrado que exhibían niveles de CHOP por debajo del límite de cuantificación (LDC) se concentraron posteriormente para obtener resultados cuantificables. Las muestras se concentraron 10 veces usando un filtro Amicon® Ultra-15 de 10 kD MWCO (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts), y una centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 5 - 25 °C, y 3200 - 4000 rpm durante 10 - 20 minutos.

Membranas

Las membranas ensayadas fueron las Mustang™ S y Q (Pall Corporation, East Hills, Nueva York) y Sartobind™ S (Sartorius-Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). Las Mustang™ S y Sartobind™ S son membranas de intercambio catiónico fuertes y la Mustang™ Q es una membrana de intercambio aniónico fuerte. Las Mustang™ S y Sartobind™ S están modificadas con una forma de ácido sulfónico y la Mustang™ Q está modificada con una forma de amina cuaternaria. Las Mustang™ S y Q están hechas de polietersulfona (PES) con poros de 0,8 µm y la Sartobind™ S está hecha de celulosa regenerada con poros de 3-5 µm. Para aumentar la capacidad de unión cada fabricante combina múltiples capas de membrana en cada dispositivo. El número total de capas y el espesor varía dependiendo del fabricante y el tamaño del dispositivo que se fabrica. El volumen de la membrana (VM), es el volumen físico de la membrana (sólidos y huecos), y se mide en unidades de ml. En este estudio se usó diversos dispositivos de membrana que representaban múltiples escalas. En la tabla 2 se enumeran las especificaciones pertinentes para cada membrana ensayada.

Sistemas de filtración

Los ensayos a pequeña escala se realizaron con un AKTA Explorer™ 100 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut), que es un sistema de purificación de proceso programable que incluye una bomba medidora integrada, sensor de presión, y un sensor de pH, conductividad y UV en línea. El sistema Explorer se programó y controló a través de un programa informático ejecutado por ordenador UNICORN™ v5.10 (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut). Los ensayos a pequeña escala también se llevaron a cabo usando un sistema manual que consistía en un programa de ahorro digital de la bomba peristáltica Masterflex® L/S® (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois), un sensor de presión en línea DTX™ Plus TNF-R (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y una balanza AND EK-1200i (A&D Company, Ltd., Tokio, Japón). La balanza se usó para controlar físicamente el caudal de la bomba midiendo la acumulación de masa. La masa se convirtió a volumen asumiendo una densidad del flujo de alimentación de 1,0 g/ml. La presión de los transductores en línea y la masa de la balanza se controlaron continuamente usando un sistema de adquisición de datos en red NetDAQ™ 2640A/41A (Fluke, Everett, Washington) que estaba unido a un programa informático ejecutado por ordenador Trendlink™ versión 3.1.1 (Canary Labs Inc., Martinsburg, Pennsylvania) y RsCom versión 2.40 (A&D Company, Ltd., Tokio, Japón) para la recogida de presión y masa, respectivamente. Se realizaron estudios a mayor escala usando un AKTA Pilot™ (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) que ejecutaba un programa UNICORN™ v5.10. El Pilot se equipó con una bomba mayor pero era funcionalmente equivalente al Explorer.

Técnicas de recogida de las muestras de filtrados

El filtrado se recogió de tres maneras distintas. Las muestras y fracciones aleatorias fueron el más común. Una muestra aleatoria es una pequeña alícuota instantánea de filtrado tomada a un rendimiento específico. Las fracciones son muestras de filtrado mayores y se definen por los intervalos de rendimiento. El filtrado también se recogió como un único conjunto grande. El análisis de los conjuntos es eficaz, pero las muestras y fracciones aleatorias son generalmente más útiles en el control de los niveles de AcMo y CHOP porque las muestras consecutivas se pueden combinar para mostrar tendencias.

10 Experimental

La materia prima se recuperó del almacenamiento en frío (2-8 °C o \leq -70 °C) y se le permitió equilibrarse a temperatura ambiente. Después se ajustó opcionalmente el pH y/o la conductividad a partir de las condiciones que se muestran en la tabla 1 usando un agente de titulación apropiado (es decir, base tris 1,5 M o ácido cítrico 1 M) o diluyente (agua purificada o cloruro sódico 5 M). Después se filtró fuera de línea usando Millipak-20 de 0,2 μ m (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts), AcroPak™ 20 (Pall Corporation, East Hills, Nueva York) o filtro de vacío de 1000 ml (Thermo Fisher Scientific, Rochester, Nueva York) para eliminar cualquier precipitado que se pudiera formar durante el almacenamiento en frío o acondicionamiento.

El sistema de filtración se preparó lavando las líneas de carga y filtrado usando agua purificada o el tampón apropiado. La membrana se situó en línea corriente abajo de la bomba de alimentación y el sensor de presión y después de lavó con 50 – 500 VM de agua purificada o tampón de equilibrio. Después de lavar, la alimentación se dirigió a la membrana y se cargó una cantidad variable a un caudal constante de 333 – 2667 VM/hora. Durante la fase de carga el filtrado se muestreó cuando fue necesario. Entonces la membrana se cazó opcionalmente con el tampón para recoger cualquier producto residual. Para mantener la retención de impurezas de la membrana, el tampón de caza (también conocido como tampón de lavado) fue generalmente similar en pH y de conductividad igual o inferior al suministro.

En algunos casos el adsorbente de la membrana se eluyó. La elución de la membrana solamente se llevó a cabo usando el Explorer o el Pilot de modo que la combinación se pudiera facilitar por el sensor UV en línea. La membrana se eluyó usando un tampón con alto contenido en sales (acetato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 350 mM, pH 5,5 o tris 25 mM y cloruro de sodio 350 mM, pH 8,0) a un caudal constante de 333 – 2667 VM/hora y se combinaron de 0,5 – 0,5 DO.

35 Procesamiento continuo

Se realizaron experimentos de procesamiento continuo en el AKTA Explorer. Durante estos experimentos el pH de la columna Q en flujo continuo se ajustó en línea y se cargó inmediatamente en la membrana Mustang™ S. La columna Q se empaquetó con resina de Q Sepharose de flujo rápido (diámetro x longitud: 1,1 cm x 20 cm). La salida de la columna se adhirió a la entrada de una conexión en T y se llevó a cabo el ajuste del pH en línea dirigiendo la "bomba β " a la entrada opuesta de la conexión en T. La conexión en T proporcionó una mezcla adecuada y la solución con el pH ajustado se dirigió a la entrada de la membrana Mustang™ S. El caudal a través de la columna se mantuvo a 100 cm/hora (1,58 ml/min). La velocidad de flujo a través de la membrana fue ligeramente mayor (aproximadamente el 2,2 %) debido al fluido añadido desde el ajuste de pH en línea.

45 Resultados

Rendimiento de la membrana de intercambio catiónico (ICat) a pequeña escala

El conjunto de intercambio aniónico de AcMo 1 a pH 5,5 y 6,0 mS/cm se procesó a lo largo de una membrana Mustang™ S de pequeña escala de 0,18 ml a un caudal constante de 667 VM/hora. El pH de AcMo 1 estaba 3,4 unidades por debajo del pI y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Las muestras aleatorias de alimentación y filtrado se analizaron con respecto a los AcMo y las impurezas de las células hospedadoras. La figura 1 muestra la reducción inicial de las CHOP en las Mustang™ S de 38 a 4,3 ppm. Las CHOP aumentaron ligeramente hasta 5,7 ppm cuando la densidad de carga aumentó hasta 16.000 g/l. Los resultados también muestran que se alcanzó un rendimiento alto, alcanzando aproximadamente el 100 % después de los 5000 g/l.

Para identificar los AcMo y las dependencias de carga, el conjunto de intercambio aniónico AcMo 2 se procesó a lo largo de una Mustang™ S a pH 5,5 y 8,0. El flujo de alimentación del AcMo 2 se separó en porciones iguales, la primera se mantuvo a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, y la segunda se ajustó a pH 5,5 y 6,4 mS/cm usando ácido cítrico 1 M. Ambos flujos de alimentación se procesaron a lo largo de una membrana Mustang™ S de pequeña escala de 0,18 ml a un caudal constante de 667 VM/hora. El AcMo 2 a pH 5,5 y 8,0 estaba por debajo del pI y por lo tanto cargado positivamente. Se analizaron muestras aleatorias de alimentación y filtrado y los resultados para las CHOP se muestran en la figura 2. A pH 5,5 la Mustang™ S inicialmente redujo las CHOP de 51 a 3,0 ppm, y de forma similar a AcMo 1, los niveles aumentaron con la densidad de carga. El rendimiento de la membrana disminuyó sustancialmente a pH 8,0, demostrando claramente que la adsorción de las CHOP es dependiente del pH. La figura 3 muestra que el rendimiento es similar en ambas condiciones de pH, y que \geq 96 % es alcanzable después de una densidad de carga

de aproximadamente 5000 g/l.

Para evaluar el rendimiento del adsorbente en un flujo de alimentación más en bruto, se procesó el conjunto de proteína A de AcMo 1 a pH 5,5 y 3,2 mS/cm a lo largo de una membrana Mustang™ S de pequeña escala de 0,18 ml a un caudal constante de 1333 VM/hora. La carga de AcMo 1 fue de 3,4 unidades por debajo del pl calculado y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Se analizaron las muestras de carga, fracciones de filtrado, y elución, y los resultados para las CHOP se muestran en la figura 4. Los datos muestran que la Mustang™ S inicialmente redujo las CHOP de 438 a 109 ppm. Las CHOP aumentaron hasta 318 ppm a medida que la densidad de carga se acercaba a los 55.300 g/l. La membrana se eluyó usando una solución con alto contenido en sales. Los iones de la sal se usan para apantallar las cargas, interrumpiendo de este modo las interacciones electrostáticas y causando que las proteínas se desorban de la superficie de la membrana y se muevan libremente dentro de la fase móvil. El análisis del conjunto de elución muestra un enriquecimiento de impurezas que confirma que las CHOP se unen a la membrana debido a fuerzas electrostáticas.

15 Rendimiento de la membrana de intercambio aniónico (IAn) a pequeña escala

Para fines comparativos se seleccionó MAb 3 para el ensayo usando una membrana de intercambio aniónico por encima del punto isoeléctrico de 7,7. Las proteínas son propensas a la desamidación y agregación a pH alto así que no se realizaron ensayos similares en los AcMo 1 y 2. Se ajustó el pH del conjunto de intercambio catiónico a pH 5,5 y 9 mS/cm a 8,0 usando base tris 1,5 M. Después se separó la materia prima en tres conjuntos separados y se ajustó la conductividad usando agua purificada. El primer conjunto estaba a 10 mS/cm, se ajustaron el segundo y el tercer conjunto a 7 mS/cm y 4 mS/cm, respectivamente. Los tres conjuntos se mantuvieron a pH 8,0. Cada materia prima se procesó después a lo largo de una Mustang™ Q de 0,35 ml de pequeña escala un caudal constante de 600 VM/hora. El pH 8,0 de AcMo 3 estaba 0,3 unidades por encima del pl y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado negativamente. Los conjuntos de carga y filtrado se analizaron y los resultados para las CHOP se muestran en la figura 5. Los datos muestran que a 4 mS/cm la Mustang™ Q redujo las CHOP de 180 a 0,6 ppm y que el aclaramiento de las impurezas disminuía a conductividades mayores, supuestamente debido al apantallamiento de los iones. La figura 5 muestra que a pesar de que el pH era de solo 0,3 unidades por encima del pl, la carga de AcMo 3 era lo suficientemente fuerte como para permitir la unión > 10 mg/ml. Como en el aclaramiento de CHOP, la unión de AcMo 3 también disminuyó a conductividades mayores. La Figura 6 muestra cómo los rendimientos para AcMo 3 aumentaron rápidamente, excediendo el 96 % después de aproximadamente 1000 g/l.

Proceso que combina las membranas ICat y IAn

El AcMo 4 se usó para ensayar la viabilidad del ensayo empleando etapas consecutivas de desplazamiento de proteínas indígenas usando membranas de intercambio tanto aniónico como catiónico. El AcMo 4 era deseable debido a que su pl de 6,7 era lo suficientemente bajo como para permitir el procesamiento a condiciones de pH tanto por encima como por debajo del punto isoeléctrico. Se ajustó conjunto de proteína A de pH 5,0 y 3,5 mS/cm a pH 8,0 y 4 mS/cm usando base tris 1,5 M. La materia prima se procesó después a lo largo de una membrana Mustang™ Q a pequeña escala de 0,18 ml a un caudal constante de 1333 VM/hora. El pH 8,0 de AcMo 4 estaba 1,3 unidades por encima del pl y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado negativamente. Las fracciones del filtrado de la Mustang™ Q se muestrearon y después se recombinaron y se ajustaron a pH 5,5 y 6,1 mS/cm usando ácido cítrico 1 M. El conjunto recombinado se procesó después a lo largo de una membrana Mustang™ S de 0,18 ml a un caudal constante de 1333 VM/hora. El pH 5,5 de AcMo 4 estaba 1,2 unidades por debajo del pl y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Las fracciones de carga y filtrado se analizaron y los resultados para CHOP para ambas membranas se muestran en la figura 7. Los datos muestran que las Mustang™ Q inicialmente redujeron las CHOP de 1215 a 555 ppm, y los niveles aumentaron de manera sostenida hasta 726 ppm a medida que la carga se aproximó a los 1700 g/l. Los resultados también muestran que las CHOP disminuyeron hasta 375 ppm después de que las fracciones recombinadas de los filtrados de las Mustang™ Q se ajustaran a pH 5,5. El motivo exacto de la disminución de las CHOP se desconoce. Los resultados para los ensayos posteriores usando las Mustang™ S muestran que los niveles de CHOP se redujeron adicionalmente a 143 ppm, y los niveles aumentaron de nuevo de manera sostenida hasta 168 ppm a medida que la carga se aproximó a los 1500 g/l. En total, los resultados demuestran que es viable combinar etapas de membranas para reducir adicionalmente las impurezas de las células hospedadoras.

55 Un proceso continuo que combina columnas y membranas

Se usó AcMo 1 para ensayar la viabilidad de usar cromatografía de columnas en modo continuo y en serie con membranas ejecutadas en modo de desplazamiento de proteína indígena. Se realizaron dos ejecuciones. Durante la primera ejecución se analizaron la columna y la membrana por separado (modo discontinuo) y durante la segunda ejecución la columna y la membrana se ejecutaron simultáneamente en serie (modo continuo). Las operaciones discontinuas para primera ejecución son las siguientes. Se cargó conjunto de proteína A de AcMo 1 acondicionado (pH 8,0 y 4,7 mS/cm) en una columna de flujo rápido de Q Sepharose. El pH de la carga de columna Q Seph FF fue de 0,9 unidades de pH por debajo del pl de modo que el anticuerpo estaba cargado positivamente, dando como resultado una fuerza repulsiva entre la resina y el AcMo. El modo de funcionamiento se puede caracterizar como la cromatografía en columna de flujo continuo tradicional. Las muestras aleatorias del flujo continuo se recogieron durante toda la ejecución. La columna se cargó hasta aproximadamente 136 g/l de resina. El conjunto Q Seph FF se recogió

y se ajustó el pH a 5,5 y 6 mS/cm usando ácido cítrico 1 M. Después se procesó a lo largo de una membrana Mustang™ S de pequeña escala de 0,18 ml a 538 VM/hora a una densidad de carga de aproximadamente 15.000 g/l de membrana. El pH de la carga de la membrana fue de aproximadamente 3,4 unidades por debajo del pI calculado y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Las muestras aleatorias de efluente de membrana se recogieron durante toda la ejecución. La membrana Mustang™ S usada se desechó y la columna Q Seph FF se regeneró usando NaOH 0,5 M y después se almacenó en NaOH 0,1 N. La segunda ejecución se realizó de un modo similar a la primera ejecución, sin embargo, se ajustó el pH del flujo continuo de la Q Seph FF en línea e inmediatamente después se cargó en la membrana Mustang™ S. Se analizaron las muestras aleatorias de la carga y la columna/membrana y los resultados de CHOP para los experimentos discontinuos (primera ejecución) y continuos (segunda ejecución) se resumen en la figura 8. Los datos muestran que las CHOP en el conjunto de proteína A se redujeron de 1450 ppm a aproximadamente 16,8 ppm a lo largo de la columna de Q Sepharose. Debería observarse que el valor de 16,8 ppm del conjunto Q se calculó basándose en los resultados de las muestras aleatorias tomadas durante toda la ejecución. Los resultados continuos y discontinuos de la Mustang™ S (12,7 y 11,1 ppm) muestran buena concordancia. En total, los datos demuestran que unir las etapas de columna y membrana en un único proceso continuo es viable y produce resultados comparables a los de las operaciones discontinuas tradicionales.

Comparación entre fabricantes de membranas

La membrana Sartobind™ S se ensayó usando AcMo 1 para comparar el rendimiento entre los fabricantes de membranas. El conjunto de intercambio aniónico de AcMo 1 a pH 5,5 y 6 mS/cm se procesó a lo largo de una membrana Sartobind™ S de pequeña escala de 0,14 ml a un caudal constante de 857 VM/hora. El pH de la carga de AcMo 1 fue de 3,4 pH unidades por debajo del pI y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Las fracciones de alimentación y filtración se analizaron para las CHOP y los resultados se muestran en la figura 9. Los datos muestran que la Sartobind™ S inicialmente redujo las CHOP de 29 hasta 3,3 ppm, y después de aproximadamente 11.500 g/l los niveles aumentaron ligeramente hasta 5,6 ppm. Los datos demuestran que las membranas Sartobind™ S y Mustang™ S tienen similar adsorción a CHOP.

Efecto del caudal

Se estudió el aclaramiento de CHOP en las Mustang™ S a 333 – 2667 VM/hora para ensayar el impacto del caudal. El conjunto de intercambio aniónico de AcMo 1 a pH 5,5 y 6 mS/cm se procesó a lo largo de cuatro membranas Mustang™ S de pequeña escala de 0,18 ml separadas del mismo lote de dispositivos. El pH de la carga de las muestras AcMo 1 fue de 3,4 unidades de pH por debajo de pI y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Se analizaron las muestras aleatorias de alimentación y filtrado para las CHOP y los resultados se muestran en la figura 10. Los datos muestran que las Mustang™ S inicialmente redujeron las CHOP de 45 a aproximadamente 6,9 ppm. Después de 16.000 g/l las CHOP aumentaron hasta una media de 8,7 ppm. Como se esperaba para un dispositivo de membrana no sujeto a las limitaciones de difusión de poro, los resultados muestran que la absorción de CHOP es independiente del caudal.

Ampliación

Se usó una membrana Mustang™ S a escala piloto para verificar el aclaramiento de CHOP y el rendimiento después de la ampliación. Se seleccionó un dispositivo de 10 mL de 16 capas debido a que es el menor dispositivo completamente representativo disponible. Se consideró completamente representativo porque el número de capas de membrana, pliegue y ensamblaje del dispositivo eran similares a los de cápsulas de escala industrial mucho más grandes. El dispositivo de 10 ml representaba un aumento de escala de 55 veces respecto al dispositivo de pequeña escala estudiado anteriormente. El conjunto de intercambio aniónico de AcMo 1 a pH 5,5 y 6 mS/cm se procesó a lo largo del adsorbente a escala piloto usando el AKTA Pilot™. El pH de la carga de AcMo 1 era de 3,4 unidades por debajo del pI y por lo tanto el anticuerpo estaba cargado positivamente. Para obtener un sentido de la reproducibilidad la carga de AcMo I se ensayó en el mismo dispositivo de 10 ml dos veces. La membrana se eluyó entre ciclos usando un tampón con alta concentración en sales (acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 350 mM, pH 5,5) y se regeneró usando NaOH 0,5 M. El caudal para todas las fases fue 546 VM/hora. Las muestras aleatorias de alimentación y filtrado y los conjuntos de elución se analizaron para las CHOP y los resultados se muestran en la figura 11. Los datos muestran buena reproducibilidad entre ciclos, lo que indica que la Mustang™ S se puede regenerar al menos una vez. El análisis de la muestra de elución mostró el enriquecimiento de impurezas, confirmando por segunda vez que la unión de CHOP a la membrana se debe a fuerzas electrostáticas. Una comparación con los resultados a pequeña escala anteriores para el AcMo 1 muestra buena concordancia para las CHOP y el rendimiento. Los datos demuestran que los dispositivos a pequeña escala son capaces de predecir el rendimiento a gran escala.

Conclusión

Las membranas de intercambio iónico demostraron ser eficaces en la eliminación de CHOP de un modo similar a la cromatografía en modo de flujo continuo pero a unas condiciones de pH y conductividad que causan la unión de AcMo. La técnica se ha denominado cromatografía de membrana de intercambio iónico de desplazamiento de proteína indígena. Los resultados han demostrado que esta técnica se puede usar para eliminar las CHOP sin la pérdida sustancial de rendimiento que ocurriría probablemente con una columna cargada de una resina tradicional a un tamaño

para mantener el rendimiento, pureza y tiempo del proceso. Los datos han mostrado que los AcMo que se han sometido previamente a una purificación parcial usando cromatografía de Proteína A y de columna de intercambio iónico pueden purificarse adicionalmente hasta niveles de CHOP inferiores a 10 ppm con rendimientos $\geq 96\%$ usando Mustang™ S, Sartobind™ S y Mustang™ Q. Se mantuvieron niveles bajos de CHOP a densidades de carga altas, y en algunos casos, el rendimiento se mantuvo a 16.000 g/l. Los resultados han mostrado que el aclaramiento de las impurezas es dependiente del pH de la carga y, en general, disminuye a mayor conductividad. Adicionalmente, los estudios de viabilidad demostraron que se pueden usar múltiples membranas en combinación para reducir adicionalmente los niveles de impurezas y que las etapas de la columna y la membrana se pueden integrar en un único proceso de purificación continuo. Una comparación entre Mustang™ S y Sartobind™ S mostró un aclaramiento de impurezas similar. A pesar de que hay diferencias notables en las membranas, los resultados fueron similares y por lo tanto el mecanismo de eliminación de las impurezas no es dependiente de la membrana. Los resultados de ensayo a caudales que varían de 333 - 2667 VM/hora fueron coherentes con la teoría y la bibliografía reivindica que el rendimiento de la membrana es independiente del caudal. Finalmente, la experimentación con un dispositivo intermedio que representa un aumento de 55 veces en escala mostró un rendimiento similar a una membrana de pequeña escala. Los datos confirman que los dispositivos a pequeña escala son capaces de predecir el rendimiento a escala de producción. Adicionalmente, el cloruro de sodio seguido de la limpieza con hidróxido de sodio del dispositivo a escala piloto entre las ejecuciones en duplicado mostraron que los adsorbentes de membrana se pueden regenerar y usarse más de una vez sin un descenso del rendimiento.

La necesidad de mejores tecnologías de purificación es clara. Aumentar los títulos de los biorreactores puede sobrecargar las plataformas de purificación basadas en proteínas, y el reto puede que no se supere solamente aumentando la capacidad de unión de las resinas. Adicionalmente, para reducir el costo de los materiales la industria necesita herramientas más convenientes y rentables. Los adsorbentes de membrana son pequeños y desechables y pueden reducir los costes de validación y de trabajo mientras que aumenta la producción de masa. Los resultados experimentales para las membranas de intercambio iónico operadas en modo de desplazamiento de proteínas indígenas mostraron un aclaramiento de impurezas y rendimiento alto, haciendo de esta técnica una opción atractiva para el bioprocesamiento.

Tabla 1: Características del flujo de alimentación

Producto	Proceso corriente arriba	Nomenclatura	Nomenclatura	Cond. mS/cm	Conc. g/l	Tipo de IgG	pI ^b
AcMo 1	Proteína A ^a	conjunto de proteína A	5,5	3,2	5,9-6,9,	1	8,9
AcMo 1	Proteína A seguida de flujo continuo de intercambio aniónico ^a	conjunto de intercambio aniónico	5,5	6,0	4,8	1	8,9
AcMo 2	Proteína A seguida de flujo continuo de intercambio aniónico a	conjunto de intercambio aniónico	8,0	5,0	5,4	1	9,3
AcMo 3	Proteína A seguida de unión/elución de intercambio catiónico	conjunto de intercambio catiónico	5,5	9,0	4,1	1	7,7
AcMo 4	Conjunto de proteína A ^a	conjunto de proteína A	5,0	3,5	3,2	4	6,7

Las muestras de la materia prima se recogieron de procesos industriales, piloto y a pequeña escala.

^a El pH y conductividad del conjunto se ajustaron previamente para asegurarse de la adecuada estabilidad del producto.

^b El punto isoeléctrico (pI) se calculó basándose en la secuencia de aminoácidos de cada AcMo.

Tabla 2: Características de la membrana

Membrana	Dispositivo	Nº de parte.	Nº de capas.	Volumen en la membrana (VM) ml	Tamaño de poro μm
Mustang™ S	Acrodisc® 25 mm	MSTG25S6	6	0,18	0,8
Mustang™ S	Cápsula	CLM05MSTGSP1	16	10	0,8
Sartobind™ S	MA5 25 mm	S5F	1	0,14	3-5
Mustang™ Q	Moneda	MSTG18Q16	16	0,18	0,8
Mustang™ Q	Acrodisc® 25 mm	MSTG25Q6	6	0,35	0,8

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar un anticuerpo monoclonal de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal y al menos un contaminante, método que comprende las etapas secuenciales de:
- 5 a. pasar la composición a través de una membrana de intercambio catiónico, en donde el anticuerpo monoclonal y la membrana tienen carga opuesta, a condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tenga un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo monoclonal y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que causa que la membrana se una al anticuerpo monoclonal y al por lo menos un contaminante, y
- 10 b. recuperar el anticuerpo monoclonal purificado del efluente.
2. Un método para purificar un anticuerpo monoclonal de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal y al menos un contaminante, método que comprende las etapas secuenciales de:
- 15 a. pasar la composición a través de una membrana de intercambio aniónico, en donde el anticuerpo monoclonal y la membrana tienen carga opuesta, en condiciones de funcionamiento que comprenden un tampón que tenga un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal y una conductividad de \leq aproximadamente 40 mS/cm, lo que causa que la membrana se una al anticuerpo monoclonal y al por lo menos un contaminante, y
- 20 b. recuperar el anticuerpo monoclonal purificado del efluente.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2 en el que la membrana de intercambio iónico tiene un tamaño de poro de 0,1 a 100 μm .
- 25 4. El método de la reivindicación 1 en el que el pH es
- (i) de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo monoclonal;
- 30 (ii) de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo monoclonal;
- (iii) de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pI del anticuerpo monoclonal; o
- (iv) de aproximadamente 1 unidad de pH por debajo del pI del anticuerpo monoclonal.
5. El método de las reivindicaciones 1 o 2 en el que la conductividad es $<$ aproximadamente 20 mS/cm o es $<$ aproximadamente 10 mS/cm.
- 35 6. El método de la reivindicación 2 en el que el pH es
- (i) de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal;
- 40 (ii) de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal;
- (iii) de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal; o
- (iv) de aproximadamente 1 unidad de pH por encima del pI del anticuerpo monoclonal.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en el que la membrana es un adsorbente en modo mixto.
- 45 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7 que además comprende someter la composición que comprende el anticuerpo monoclonal a una o más etapa(s) de purificación adicional(es)
- (i) bien antes, durante o después de las etapas de a hasta b, siendo dicha etapa de purificación cromatografía de afinidad de proteína A;
- 50 (ii) bien antes, durante o después de las etapas de a hasta b, siendo dicha etapa de purificación cromatografía de intercambio iónico; o
- (ii) se ejecutan de forma continua durante las etapas de a hasta b, siendo dicha etapa de purificación cromatografía de intercambio iónico.
- 55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8 que además comprende preparar una composición farmacéutica combinando el anticuerpo monoclonal purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de HER2, anticuerpos de EGFR, anticuerpos de CD20, anticuerpos de CD22, anticuerpos de VEGF, anticuerpo del receptor de VEGF, anticuerpos de IgE, anticuerpos del receptor de Apo-2 y anticuerpos de TNF-alfa.
- 60 11. El método de la reivindicación 10 en el que el anticuerpo es
- 65 (i) un anticuerpo de HER2 seleccionado del grupo que consiste en trastuzumab y pertuzumab;

- (ii) el anticuerpo de CD20 rituximab;
- (iii) el anticuerpo de VEGF bevacizumab; o
- (iv) el anticuerpo de IgE omalizumab.

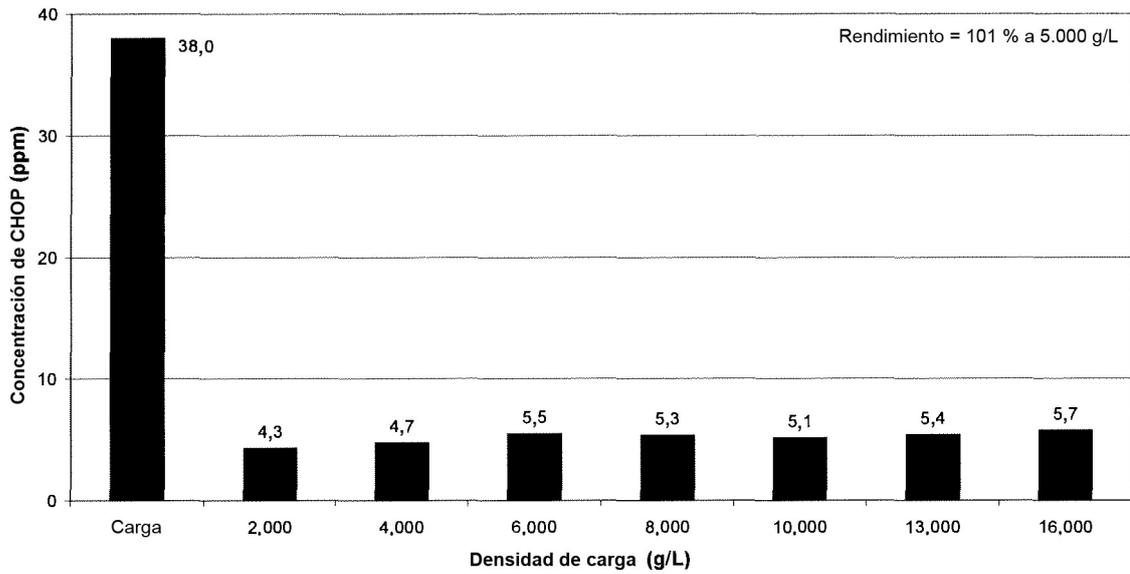


Figura 1: Aclaramiento de CHOP para el conjunto de intercambio de aniones de AcMo1 a pH 5,5, y 6,0 mS/cm Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/hora).

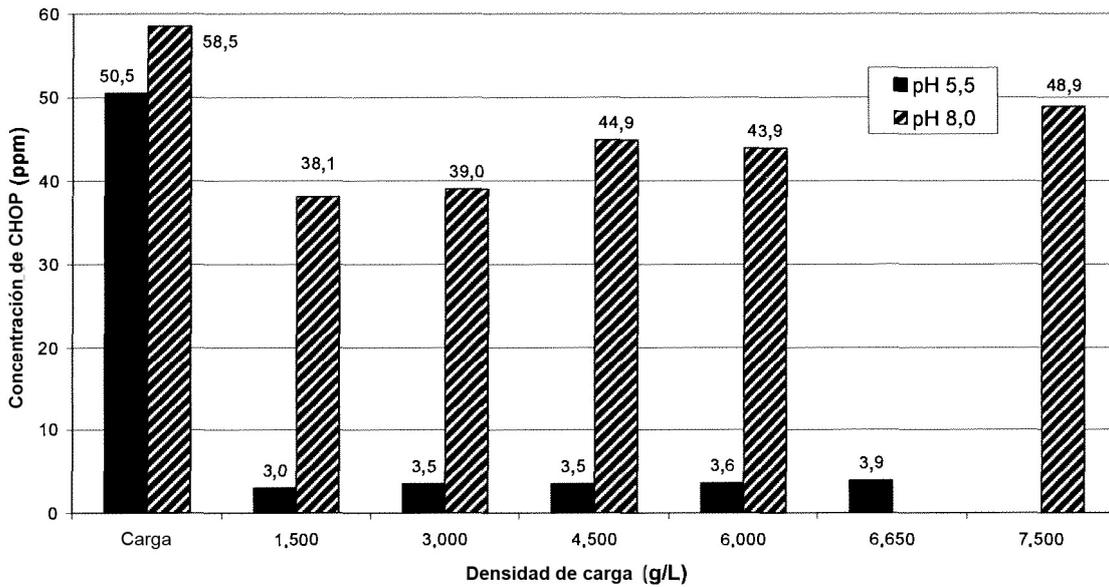


Figura 2: Aclaramiento de CHOP para el conjunto de intercambio de aniones de AcMo 2 a pH 5,5, y 6,4 mS/cm, y a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/hora).

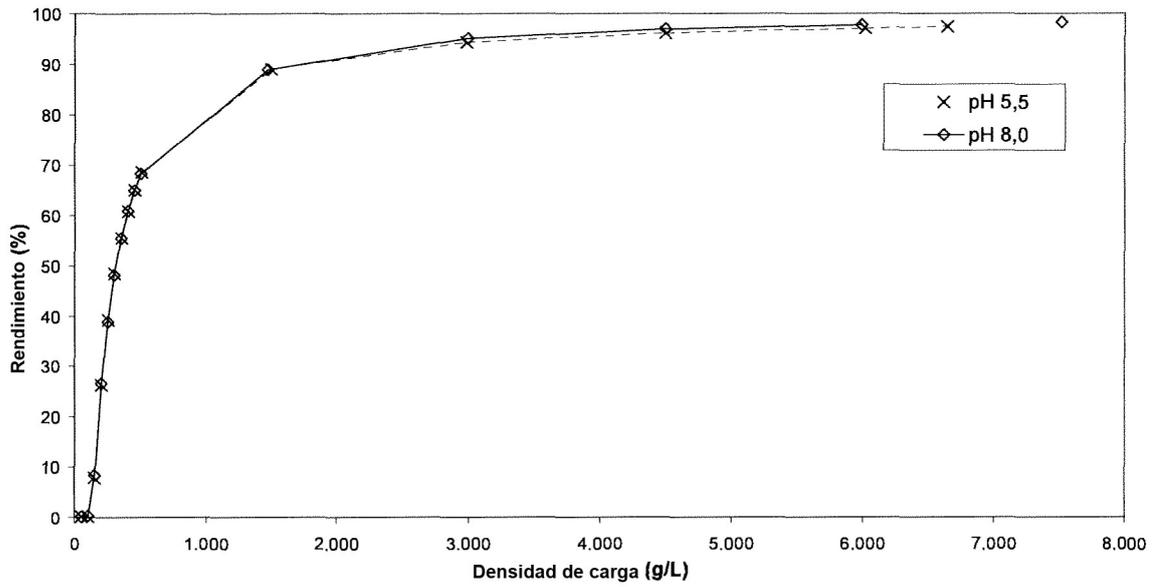


Figura 3: Rendimiento para el conjunto de intercambio aniónico de AcMo2 a pH 5,5, y 6,4 mS/cm, y a pH 8,0 y 5,0 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 667 VM/hora).

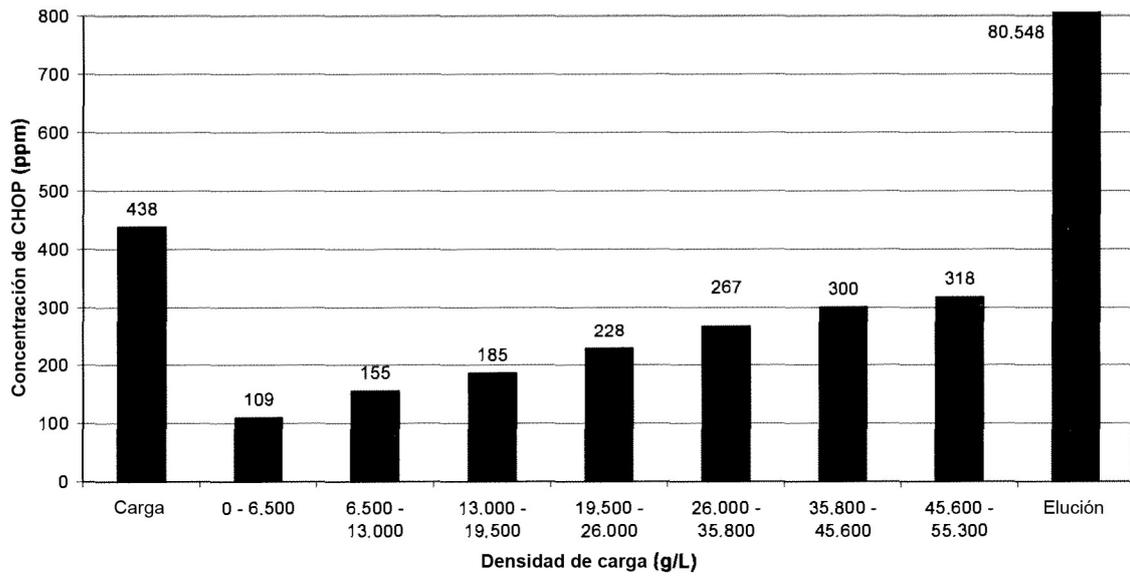


Figura 4: Aclaramiento de CHOP para el conjunto de Proteína A de AcMo1 a pH 5,5, 3,2 mS/cm Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/hora)

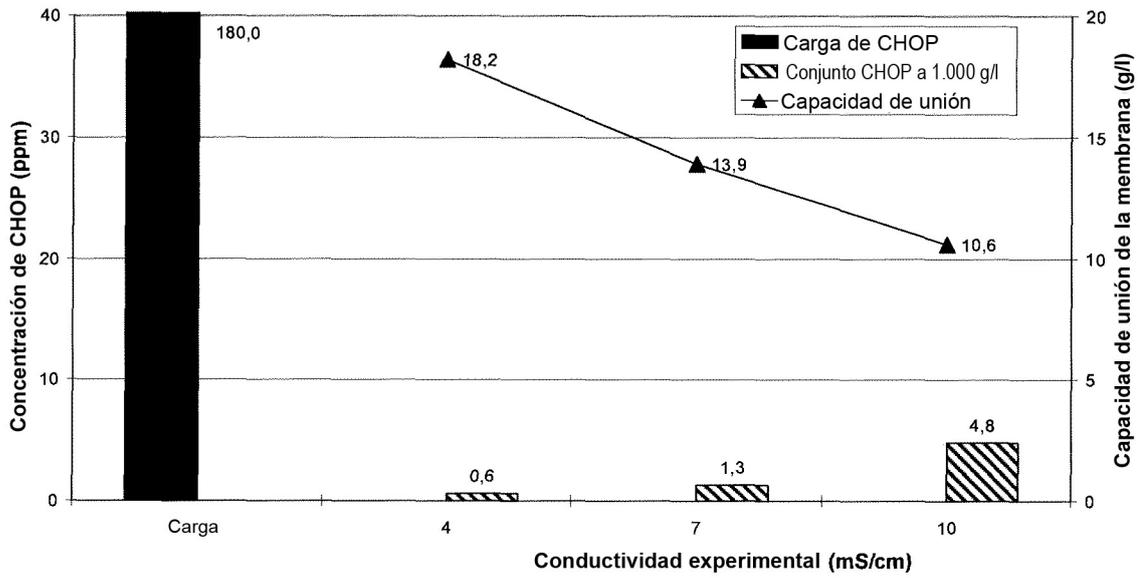


Figura 5: CHOP (barras) y capacidad de unión (línea) para AcMo 3 a pH 8,0, Mustang™ Q (Pequeña escala, 0,35 ml VM, 600 VM/hora).

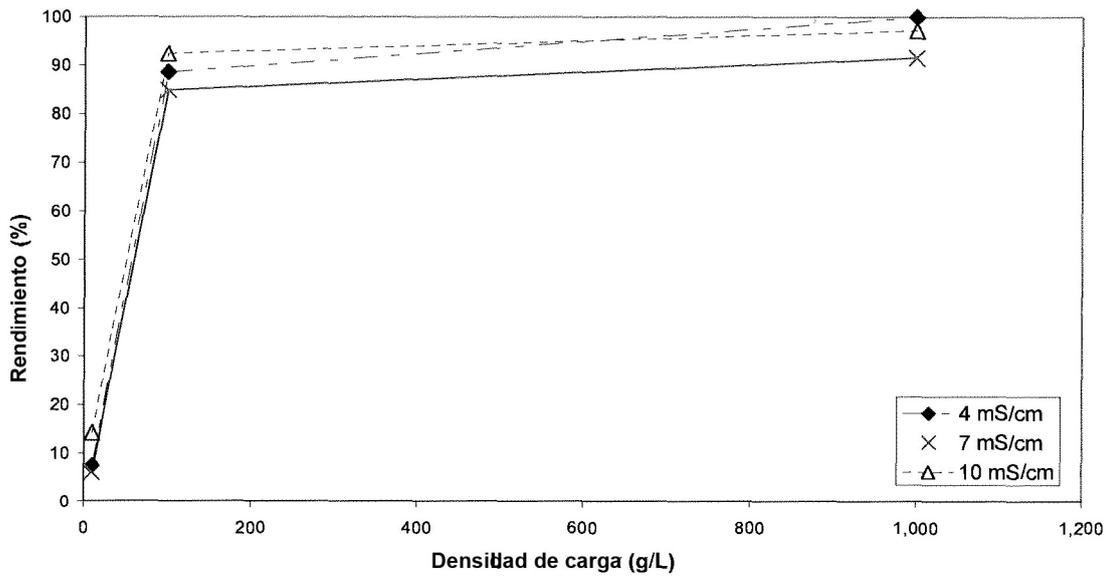


Figura 6: Rendimiento para el conjunto de intercambio catiónico de AcMo 3 a pH 8,0, Mustang™ Q (Pequeña escala, 0,35 ml VM, 600 VM/hora)

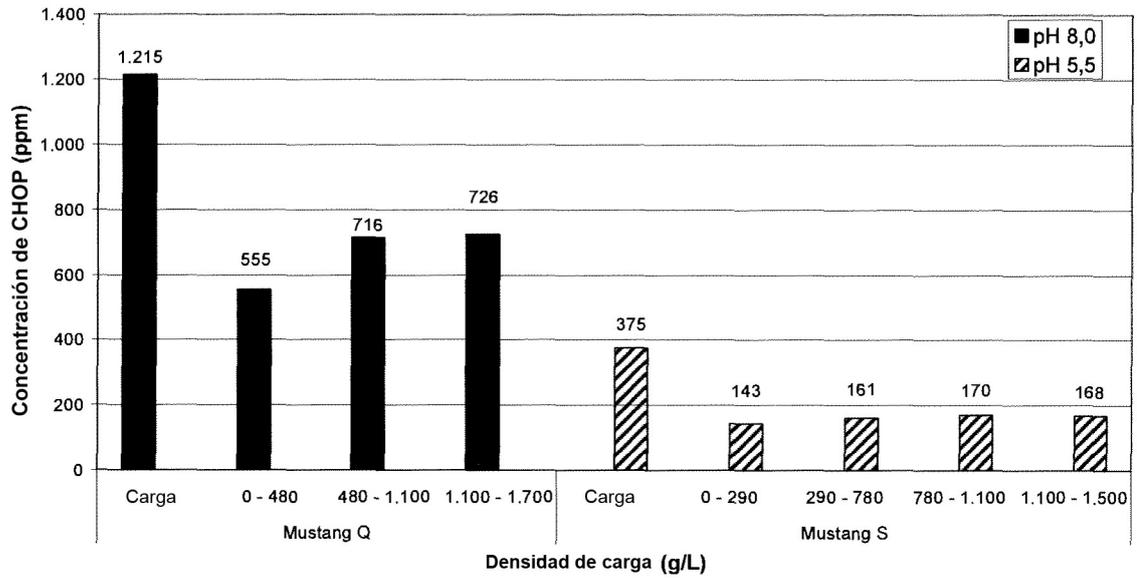


Figura 7: Niveles de CHOP para AcMo4 a pH 8,0 y 4,0 mS/cm, Mustang™ Q (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/hora) y después a pH 5,5 y 6,1 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM, 1333 VM/hora).

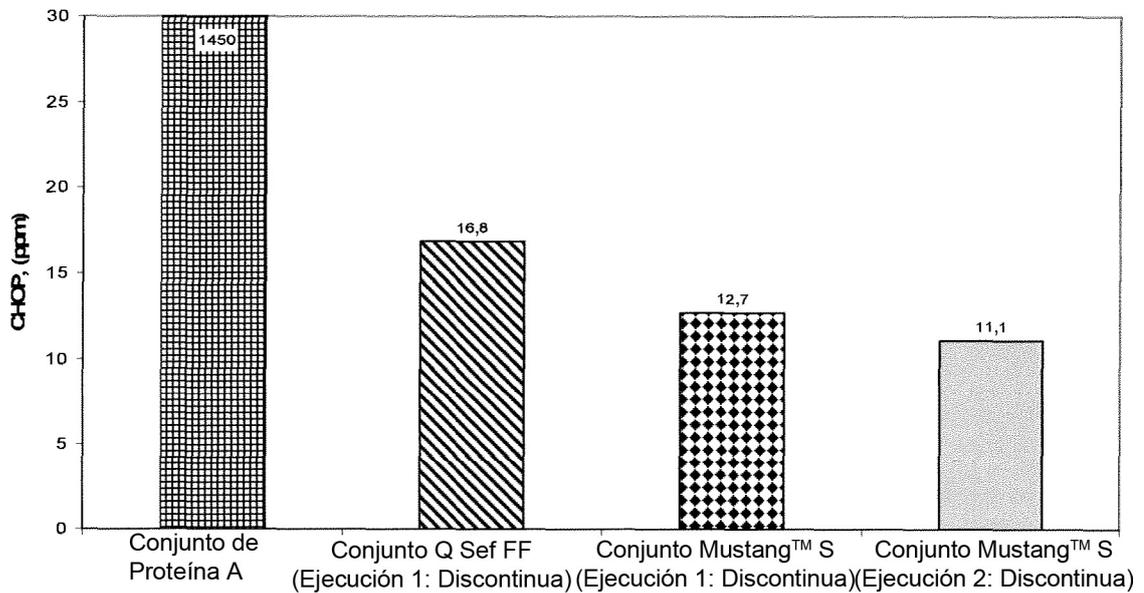


Figura 8: Aclaramiento de CHOP para AcMo1 a pH 8,0 y 4,0 mS/cm a lo largo de una columna de Q Sefarosa de flujo rápido ejecutada en modo de flujo continuo 100 cm/hora (rayas) y purificación posterior en una Mustang™ S en modo discontinuo (rombos) y continuo (gris sólido) a aproximadamente pH 5,5 y 6 mS/cm (pequeña escala, 0,18 ml VM, 538 VM/hora).

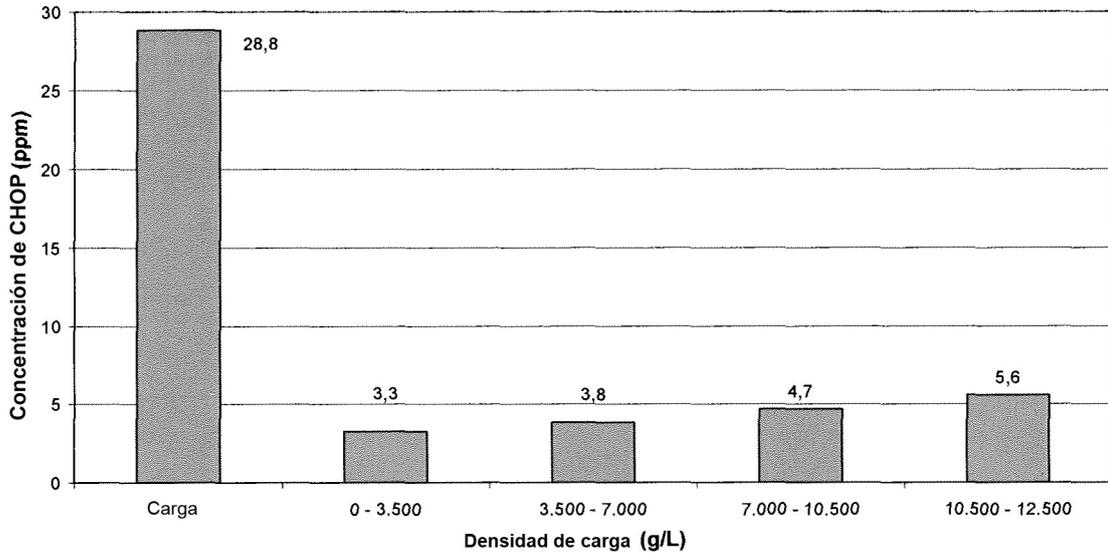


Figura 9: Aclaramiento de CHOP para AcMo1 a pH 5,5 y 6 mS/cm, Sartobind™ S (pequeña escala, 0,14 ml VM, 857 VM/hora)

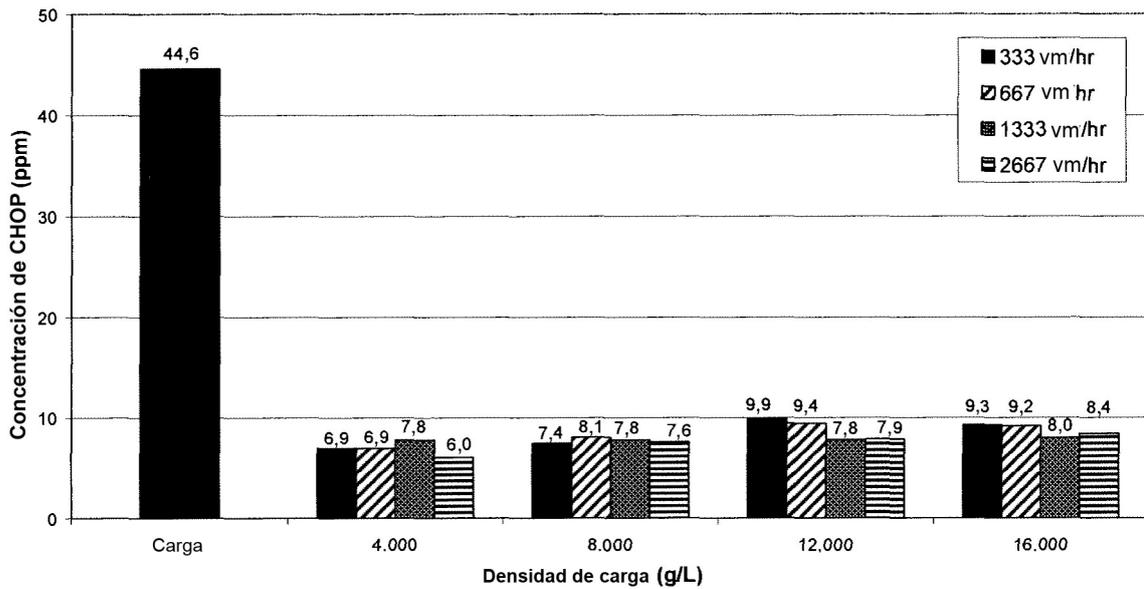


Figura 10: Aclaramiento de CHOP para AcMo1 a pH 5,5 y 6 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 0,18 ml VM).

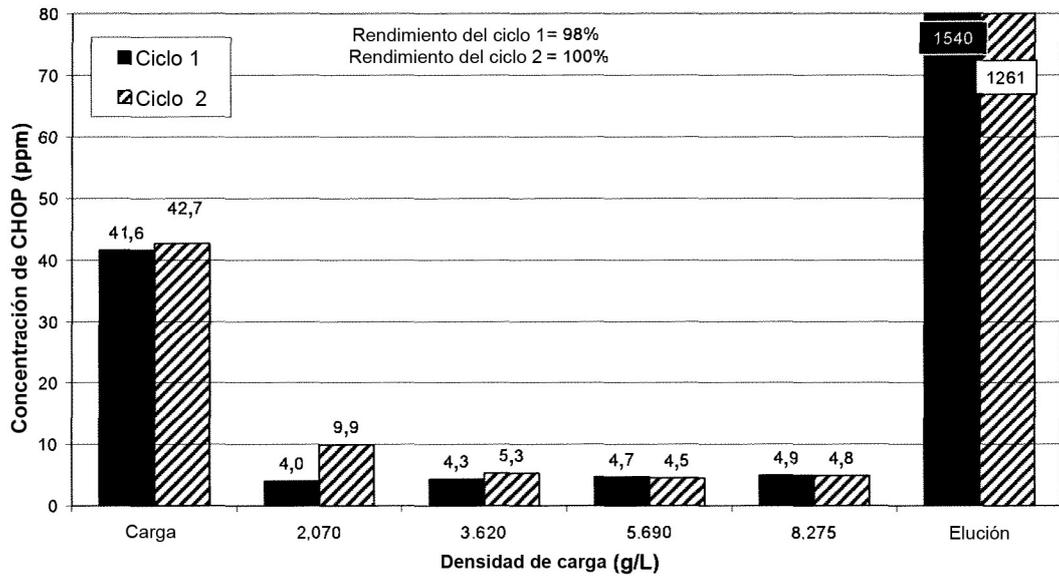


Figura 11: Aclaramiento de CHOP para AcMo1 a pH 5,5 y 6 mS/cm, Mustang™ S (pequeña escala, 10 ml VM, 546 VM/hora).

Figura 12

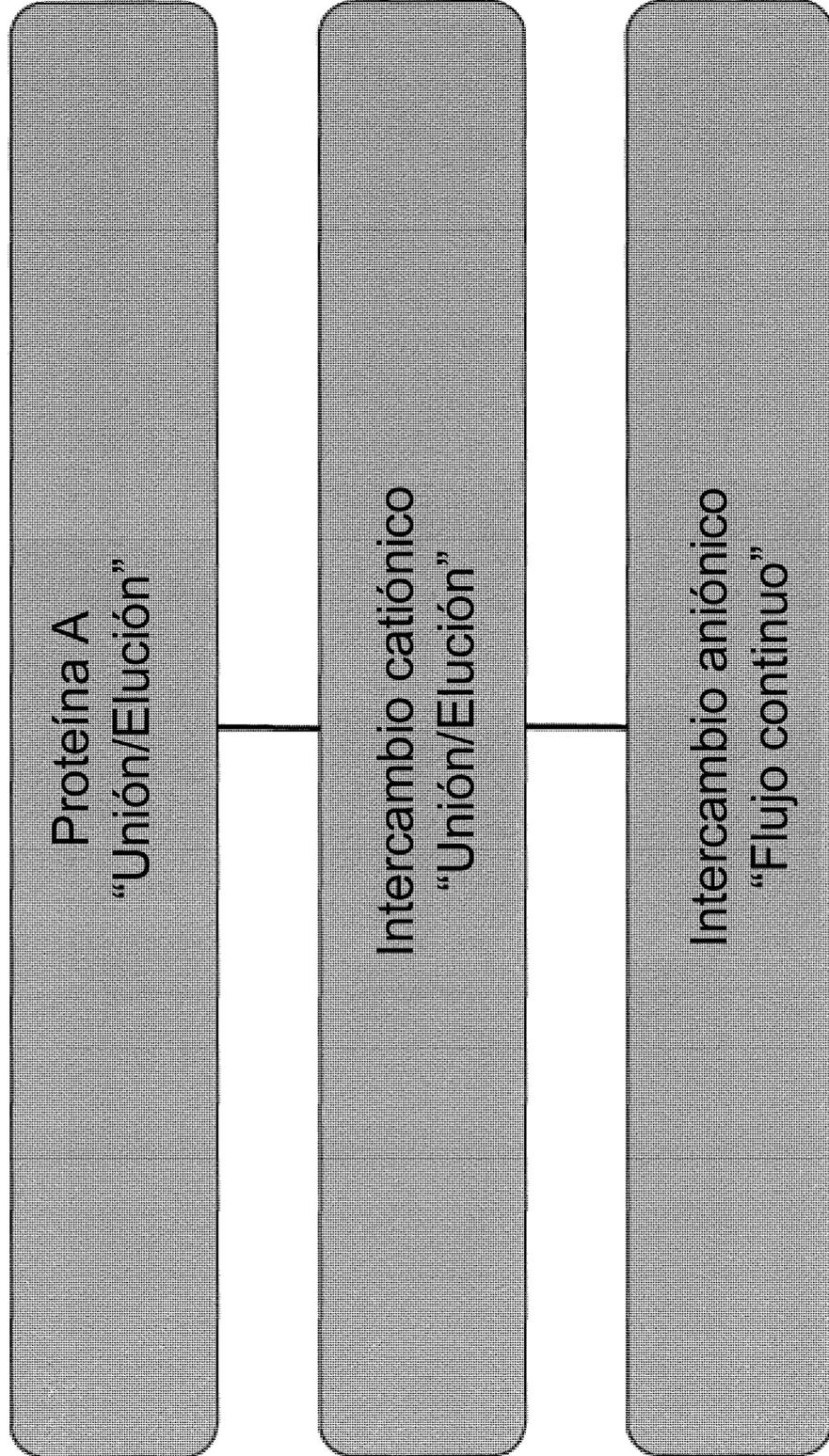


Figura 13

