

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 222**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2007 PCT/US2007/077865**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2008 WO08031020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 07814753 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2059258**

54 Título: **Lavado con arginina en la purificación de proteínas mediante el uso de cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

08.09.2006 US 843084 P

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**SUN, SHUJUN y
GALLO, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 764 222 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

Lavado con arginina en la purificación de proteínas mediante el uso de cromatografía de afinidad

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 U.S.C. § 119(e) para la solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 60/843.084, presentada el 8 de septiembre del 2006.

Campo técnico

La presente solicitud se refiere a la purificación de proteínas. Particularmente, la presente solicitud se refiere a procedimientos de purificación de una proteína unida a un medio pasando al menos una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina a través del medio, y recogiendo la proteína purificada.

10 Antecedentes

15 Con el desarrollo de la tecnología de las proteínas recombinantes, puede producirse una proteína de interés mediante el uso de las líneas celulares huésped eucariotas o procariotas cultivadas, diseñadas para expresar la proteína. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas generalmente depende de la capacidad de recuperar de manera confiable, los niveles adecuados de la proteína a partir de impurezas tales como las proteínas de las células huésped, las variantes de las proteínas y los compuestos del medio de cultivo.

20 Los procedimientos de purificación de proteínas convencionales están diseñados para separar la proteína de interés de las impurezas en función de las diferencias en el tamaño, la carga, la solubilidad y el grado de hidrofobicidad. Tales procedimientos incluyen procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de interacciones hidrófobas, la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y la cromatografía de hidroxiapatita. Estos procedimientos a menudo emplean un medio de separación que puede diseñarse para adherir selectivamente ya sea la proteína de interés o las impurezas. En el modo de elución por unión, la proteína deseada se une selectivamente al medio de separación y se eluye diferencialmente del medio con diferentes disolventes. En el modo de flujo continuo, las impurezas se unen específicamente al medio de separación mientras que la proteína de interés no lo hace, lo que permite la recuperación de la proteína deseada en el "flujo continuo".

30 Los procedimientos actuales para la purificación de las proteínas, tales como los anticuerpos, incluyen dos o más etapas cromatográficas. Por ejemplo, la primera etapa en el protocolo de purificación de las proteínas puede implicar un paso de cromatografía de afinidad que utiliza una interacción específica entre la proteína de interés y un reactivo de captura inmovilizado. Los adsorbentes de Proteína A son particularmente útiles para la captura por afinidad de las proteínas tales como los anticuerpos que contienen una región Fc. Sin embargo, existen numerosos inconvenientes para el uso de la cromatografía con Proteína A para la purificación de proteínas. En algunos casos, la fuga del agente de captura Proteína A da lugar a la contaminación del producto de proteínas eluidas, mientras que en otros casos, la captura por afinidad no separa las variantes proteicas, tales como las formas agregadas de la proteína, de la proteína de interés. Además, pueden formarse niveles variables de turbidez y/o precipitados en la fracción de elución de la Proteína A después de la neutralización del pH. Esta turbidez y/o precipitación puede conducir a pérdidas significativas del producto en la fracción de elución de la Proteína A neutralizada. Como consecuencia, existe la necesidad de procedimientos de purificación que reduzcan las pérdidas del producto y mejoren la pureza del producto en la fracción de elución.

40 Los procedimientos para purificar proteínas se conocen a partir de los documentos WO02/098531, US2005/0107594 y DAISUKE EJIMA y otros: "Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol. 345, núm. 2, 1 de octubre de 2005 (2005-10-01), páginas 250-257. En estas publicaciones, sin embargo, se usa una solución de arginina para la etapa de elución y no para el lavado.

Sumario de la invención

45 La invención se refiere a los procedimientos de purificación de un anticuerpo monoclonal que contiene Fc de acuerdo con la reivindicación 1.

En algunas realizaciones el procedimiento es definido por cualquiera de las reivindicaciones 2-11.

50 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque los procedimientos y los materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos y los materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, los procedimientos, y los ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, los dibujos y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan el porcentaje de recuperación (%), la turbidez, las HCP ("proteínas de la célula huésped") y el LRV ("logaritmo del valor de eliminación") de mAb-1 anti-GDF-8 después de una etapa en columna de Proteína A.

- 5 La Figura 2 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan el porcentaje de recuperación (%), la turbidez, las HCP y el LRV de mAb-2 anti-GDF-8 después de una etapa en columna de Proteína A.

- 10 La Figura 3 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan el porcentaje de recuperación (%), la turbidez, las HCP y el LRV de mAb-1 anti-IL-13 después de una etapa en columna de Proteína A.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan el porcentaje de recuperación (%), la turbidez, las HCP y el LRV de mAb anti-IL-22 después de una etapa en columna de Proteína A.

La Figura 5 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan el porcentaje de recuperación (%), la turbidez, las HCP y el LRV de mAb anti-RAGE después de una etapa en columna de Proteína A.

- 15 La Figura 6 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos que analizan la turbidez de mAb-2 anti-IL-13 después de una etapa en columna de Proteína A.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención proporciona los procedimientos de purificación y recuperación de los productos a partir de un fluido de carga que contiene una o más impurezas mediante el uso de un procedimiento que incluye un lavado con arginina o un lavado con un derivado de arginina. La invención puede aplicarse a la preparación a gran escala de proteínas con fines terapéuticos y/o de diagnóstico.

A. Definiciones

Para que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, se definen ciertos términos usados en la presente memoria. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

- 25 El término "producto" se refiere a una molécula producida por los seres humanos o por un proceso natural. Un "producto" puede incluir, sin limitarse a, una proteína, por ejemplo, una proteína terapéutica, que incluye una proteína de fusión a Ig que incluye proteínas que contienen Fc. Otras proteínas incluyen un inmunocombinado, una citocina, una interleucina, una hormona, una enzima terapéutica, un virus, un suero terapéutico, una toxina, una antitoxina, una vacuna, un componente o derivado de la sangre, o cualquier producto análogo. La proteína puede ser una proteína secretada. La proteína puede ser, *por ejemplo*, un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un receptor soluble, una fusión de receptor, una citocina, un factor de crecimiento, una enzima o un factor de coagulación. Como se usa en la presente memoria, los términos "producto" y "proteína de interés" se usan indistintamente.

- 30 El término "proteína", como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad. El término "polipéptido", como se usa en la presente memoria, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos.

- 35 Una proteína terapéutica puede ser, por ejemplo, una proteína secretada. Las proteínas terapéuticas incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, receptores solubles, fusiones de receptores, citocinas, factores de crecimiento, enzimas o factores de coagulación, algunos de los cuales se describen con más detalle en la presente memoria a continuación. La lista anterior de proteínas es simplemente de naturaleza ejemplar y no pretende ser una recitación limitante. Un experto en la técnica entenderá que puede usarse cualquier proteína de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular que se producirá según sea necesario. La expresión "medio de cultivo acondicionado" como se usa en la presente memoria se refiere al sobrenadante que se genera a partir de la eliminación de las células y los desechos celulares mediante un procedimiento de separación, tal como la centrifugación y/o microfiltración, del medio de cultivo celular que se ha expuesto a las células huésped, que pueden secretar el(los) polipéptido(s) recombinante(s) de interés. El medio acondicionado puede contener, por ejemplo, el polipéptido recombinante secretado o el producto de interés; los nutrientes seleccionados (*por ejemplo* vitaminas, aminoácidos, cofactores y minerales); factores de crecimiento/suplementos adicionales que incluyen la insulina; y proteínas e impurezas de las células huésped o exógenas adicionales. La expresión medio de cultivo acondicionado incluye medio acondicionado clarificado, medio acondicionado filtrado y medio de cultivo celular acondicionado.

- 40 El término "fluido de carga" se refiere a un líquido que contiene el producto a aislar y una o más impurezas. Un fluido de carga hace contacto con un medio (*por ejemplo*, se pasa a través de un medio) en las condiciones de operación de la invención descritas más adelante.

El término "impureza" se refiere a cualquier molécula extraña o no deseada que esté presente en una solución tal como un fluido de carga. Una impureza puede ser una macromolécula biológica tal como un ADN, un ARN o una

- 5 proteína, distinta de la proteína de interés que se purifica, que está además, presente en una muestra de la proteína de interés que se purifica. Las impurezas incluyen, por ejemplo, las variantes de las proteínas no deseadas, tales como proteínas agregadas, proteínas mal plegadas, proteínas unidas bajo disulfuro, especies de alto peso molecular, especies y fragmentos de bajo peso molecular y especies desamidadas; otras proteínas de las células huésped que secretan la proteína que se purifica, ADN de la célula huésped, componentes del medio de cultivo celular, moléculas que forman parte de un absorbente usado para la cromatografía de afinidad que se lixivia en una muestra durante las etapas de purificación anteriores, por ejemplo, la Proteína A; una endotoxina; un ácido nucleico; un virus o un fragmento de cualquiera de los anteriores.
- 10 El término "medio" se refiere a una matriz o resina de afinidad que puede experimentar una interacción ligando-biomacromolécula con un producto a aislar durante un proceso de separación macromolecular. El medio puede ser, sin limitación, una columna de cromatografía con Proteína A o una columna de cromatografía con Proteína G.
- El término "medio unido" se refiere a un medio unido con un producto a aislar y unido además, con una o más impurezas. Puede crearse un medio unido pasando un fluido de carga a través de un medio en condiciones adecuadas para unir el producto.
- 15 El término "medio lavado" se refiere a un medio unido que se lava con una o más soluciones de lavado, y al menos una solución de lavado contiene arginina o un derivado de arginina. Puede crearse un medio lavado poniendo en contacto un medio unido con una o más soluciones de lavado, y al menos una solución de lavado incluye arginina o un derivado de arginina. En el medio lavado, la pureza del producto a aislar generalmente aumenta en relación con el fluido de carga en el medio unido (*es decir*, aumenta la relación del producto con respecto a una o más impurezas).
- 20 La expresión "modo de elución por unión" se refiere a una técnica de preparación de productos en la que al menos un producto contenido en un fluido de carga se une a un medio (*por ejemplo*, una resina cromatográfica).
- El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de esta, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, de cadena simple, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados *in vitro*. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, que pueden retener la función de unión al antígeno. Típicamente, tales fragmentos incluyen un dominio de unión al antígeno.
- 25 El término "IL-13" se refiere a la interleucina-13, que incluye la forma precursora no procesada de longitud completa de IL-13, así como las formas maduras que resultan de la escisión postraduccional. La interleucina-13 (IL-13) es una citocina previamente caracterizada secretada por linfocitos T y mastocitos (McKenzie y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3735-39; Bost y otros (1996) Immunology 87:663-41). El término se refiere, además, a los fragmentos y variantes de IL-13 que mantienen al menos algunas actividades biológicas asociadas con la IL-13 madura, incluidas las secuencias que se han modificado. El término "IL-13" incluye la IL-13 humana, así como otras IL-13 derivadas de especies de vertebrados. Varias solicitudes pendientes divulgan anticuerpos contra la IL-13 humana y de mono, péptidos de IL-13, vectores y células huésped que producen los mismos que pueden usarse en los procedimientos descritos en la presente memoria, por ejemplo, publicaciones de solicitud de los Estados Unidos núms. 2006/0063228A y 2006/0073148.
- 30 La IL-13 comparte varias actividades biológicas con la IL-4. Por ejemplo, la IL-4 o IL-13 puede provocar el cambio a isotipo IgE en las células B (Tomkinson y otros (2001) J. Immunol. 166:5792-5800). Además, se han informado niveles aumentados de CD23 en la superficie celular y CD23 en suero (sCD23) en pacientes asmáticos (Sanchez-Guerrero y otros (1994) Allergy 49:587-92; DiLorenzo y otros (1999) Allergy Asthma Proc. 20:119-25). Además, la IL-4 o IL-13 puede regular positivamente la expresión del MHC clase II y el receptor de IgE de baja afinidad (CD23) en las células B y monocitos, lo que da lugar a una presentación mejorada del antígeno y una función regulada de los macrófagos (Tomkinson y otros, *supra*). Estas observaciones indican que la IL-13 desempeña un papel importante en el desarrollo
- 35 de la eosinofilia de las vías aéreas y la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) (Tomkinson y otros, *supra*; Wills-Karp y otros (1998) Science 282:2258-61). En consecuencia, la inhibición de IL-13 puede ser útil para mejorar la patología de ciertas afecciones inflamatorias y/o alérgicas, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos respiratorios, *por ejemplo*, asma; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); otras afecciones que implican la inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y producción excesiva de moco, *por ejemplo*, fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos *por ejemplo*, dermatitis atópica, urticaria, eccema, rinitis alérgica; afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias de la piel (*por ejemplo*, dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (*por ejemplo*, enfermedades inflamatorias del intestino (EII), tales como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), hígado (*por ejemplo*, cirrosis, carcinoma hepatocelular); esclerodermia; tumores o cánceres (*por ejemplo*, tumores sólidos o de tejidos blandos), tales como leucemia, glioblastoma y linfoma, *por ejemplo*, Linfoma de Hodgkin; infecciones virales (*por ejemplo*, de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, *por ejemplo*, fibrosis del hígado, (*por ejemplo*, fibrosis provocada
- 40 por un virus de la hepatitis B y/o C).
- 45 El término "GDF-8" se refiere al Factor de crecimiento y diferenciación 8 y a factores que están estructuralmente o funcionalmente relacionados con el GDF-8, por ejemplo, BMP-11 y otros factores que pertenecen a la superfamilia del TGF-β. El término se refiere a la forma precursora sin procesar de longitud completa del GDF-8, así como a las formas
- 50
- 55

maduras y propeptídicas que resultan de la escisión postraducciona. El término se refiere además, a cualquiera de los fragmentos y variantes de GDF-8 que mantienen al menos algunas actividades biológicas asociadas con el GDF-8 maduro, incluidas las secuencias que se han modificado. Se describen las secuencias de aminoácidos de GDF-8 humano, así como GDF-8 de otras especies de vertebrados (que incluyen murino, babuino, bovino y pollo), *por ejemplo, en los documentos* US 2004-0142382, US 2002-0157125y McPherron y otros. (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 94:12457-12461. Se describen ejemplos de anticuerpos neutralizantes contra GDF-8, *por ejemplo, en el documento* US 2004-0142382, y pueden usarse para tratar o prevenir afecciones en las que se desea un aumento en el tejido muscular o la densidad ósea. Las enfermedades y trastornos ejemplares incluyen trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); la esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular; atrofia de órganos; fragilidad; síndrome del túnel; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular; trastornos del tejido adiposo (*por ejemplo, la obesidad*); diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; síndromes metabólicos (*por ejemplo, síndrome X*); resistencia a la insulina inducida por traumatismos tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno; y enfermedades degenerativas óseas (*por ejemplo, osteoartritis y osteoporosis*).

El GDF-8, conocido además como miostatina, es una proteína secretada y es miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) de factores de crecimiento relacionados estructuralmente, todos los cuales poseen propiedades de regulación del crecimiento y morfogenéticas fisiológicamente importantes (Kingsley y otros (1994) Genes Dev., 8: 133-146; Hoodless y otros (1998) Curr. Topics Microbiol. Immunol., 228: 235-272). Similar al TGF- β , el GDF-8 humano se sintetiza como una proteína precursora de 375 aminoácidos de longitud. La proteína GDF-8 precursora forma un homodímero. Durante el procesamiento, el propéptido amino terminal se escinde en Arg-266. El propéptido escindido, conocido como el "péptido asociado a la latencia" (LAP), puede permanecer unido de forma no covalente al homodímero, inactivando de este modo el complejo (Miyazono y otros (1988) J. Biol. Chem 263: 6407-6415; Wakefield y otros (1988) J. Biol. Chem 263: 7646-7654; Brown y otros (1990) Growth Factors, 3: 35-43; y Thies y otros (2001) Growth Factors, 18: 251-259). El complejo de GDF-8 maduro con propéptido se conoce comúnmente como el "complejo latente pequeño" (Gentry y otros (1990) Biochemistry, 29: 6851-6857; Derynck y otros (1995) Nature, 316: 701-705; y Massague (1990) Ann. Rev. Cell Biol., 12: 597-641). Se sabe también que otras proteínas se unen al GDF-8 maduro e inhiben su actividad biológica. Tales proteínas inhibitoras incluyen la folistatina y las proteínas relacionadas con la folistatina (Gamer y otros (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

El término "RAGE" se refiere al Receptor para productos finales de glicación avanzada. El RAGE es un miembro de superficie celular para múltiples ligandos de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El RAGE consiste en un dominio extracelular, un dominio único que abarca la membrana y una cola citosólica. El dominio extracelular del receptor consiste en un dominio de inmunoglobulina de tipo V seguido de dos dominios de inmunoglobulina de tipo C. El RAGE existe además, en forma soluble (sRAGE). El RAGE es un receptor de reconocimiento de patrones que se une a varias clases diferentes de moléculas endógenas que conducen a diversas respuestas celulares, que incluyen la secreción de citocinas, el aumento del estrés oxidativo celular, el crecimiento neurítico y la migración celular. Los ligandos de RAGE incluyen productos finales de glicación avanzada (AGE), que se forman en estados hiperglucémicos prolongados. Además de los AGE, los ligandos conocidos de RAGE incluyen proteínas que tienen fibrillas de lámina β que son características de los depósitos amiloides y mediadores proinflamatorios, que incluyen S100/calgranulinas (*por ejemplo, S100A12, S100B, S100A8-A9*), amiloide sérico (SAA) (forma fibrilar), proteína beta-Amiloide (A-Beta) y proteína 1 cromosómica de alta movilidad del grupo de caja-1 (HMGB1, conocida además como anfoterina). El RAGE se expresa por muchos tipos de células, *por ejemplo, células endoteliales y de músculo liso, macrófagos y linfocitos*, y en muchos tejidos diferentes, que incluyen pulmón, corazón, riñón, músculo esquelético y cerebro. La expresión se aumenta en estados inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide y la nefropatía diabética. Aunque su función fisiológica no está clara, el RAGE está implicado en la respuesta inflamatoria y puede tener un papel en diversos procesos de desarrollo, que incluyen la diferenciación de mioblastos y el desarrollo neural. Varios trastornos humanos significativos están asociados con una mayor producción de ligandos para RAGE o con una producción aumentada de RAGE en sí. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, muchas enfermedades inflamatorias crónicas, que incluyen la artritis reumatoide y psoriásica y la enfermedad intestinal, cánceres, diabetes y nefropatía diabética, amiloidosis, enfermedades cardiovasculares y sepsis. Por ejemplo, se ha demostrado que uno de los ligandos para RAGE, el HMGB-1, es un mediador tardío de la letalidad en dos modelos de sepsis murina, y se cree que la interacción entre el RAGE y los ligandos tales como el HMGB1 juega un papel importante en la patogénesis de la sepsis y otras enfermedades inflamatorias.

El término "A-Beta" se refiere al componente principal de las placas amiloideas dentro del cerebro. El péptido A-Beta es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glucoproteína de membrana más grande llamada proteína precursora amiloidea (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretadas, A-Beta se encuentra principalmente tanto en forma corta, de 40 aminoácidos de longitud, como en forma larga, que varía de 42-43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio hidrofóbico de membrana de la APP se encuentra en el extremo carboxi de A-Beta, y puede explicar la capacidad de A-Beta para agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas amiloides en el cerebro con el tiempo conduce a la muerte celular neuronal. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer (AD). La acumulación de placas amiloideas en el cerebro se asocia además, con el síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de AD (ver, *por ejemplo*, Goate y otros, Nature 349:704, 1991 (valina717 a isoleucina); Chartier Harlan y otros. Nature 353: 844, 1991 (valina 717 a glicina); Murrell y otros, Science 254:97, 1991 (valina717 a fenilalanina); Mullan y otros, Nature Genet. 1:345, 1992 (una mutación doble que cambia la lisina595-metionina596 a asparagina595-leucina596). Se cree que tales mutaciones causan AD por el procesamiento aumentado o alterado de APP a A-Beta, particularmente el procesamiento de APP a cantidades aumentadas de la forma larga de A-Beta (es decir, A-Beta1-42 y A-Beta1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento de APP para generar mayores cantidades de A-Beta de forma larga (ver Hardy, TINS 20: 154, 1997). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-A-Beta se purifican de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "IL-22" se refiere a la interleucina-22, que incluye la forma precursora de IL-22 sin procesar de longitud completa, así como las formas maduras que resultan de la escisión postraduccional. El término se refiere, además, a los fragmentos y variantes de IL-22 que mantienen al menos algunas actividades biológicas asociadas con la IL-22 madura, incluidas las secuencias que se han modificado. El término "IL-22" incluye la IL-22 humana, así como otras especies de vertebrados. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la IL-22 humana y de roedores, así como los anticuerpos contra la IL-22 se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de los Estados Unidos núms. 2003-0157106, 2005-0153400, 2005-0042220 y 2005-0158760, y la patente de los Estados Unidos núm. 6,939,545.

La interleucina-22 (IL-22) es una citocina de clase II previamente caracterizada que muestra homología de secuencia con la IL-10. Su expresión está regulada en las células T por la IL-9 o por la Concanavalina A (ConA) (Dumoutier L. y otros (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(18):10144-9). Los estudios han demostrado que la expresión del ARNm de IL-22 se induce *in vivo* en respuesta a la administración del lipopolisacárido (LPS), y que la IL-22 modula los parámetros indicativos de una respuesta de fase aguda (Dumoutier L. y otros (2000) *supra*; Pittman D. y otros (2001) Genes and Immunity 2:172), y que una reducción de la actividad de la IL-22 mediante el uso de un anticuerpo neutralizante anti-IL-22 mejora los síntomas inflamatorios en un modelo de artritis inducida por colágeno de ratón (CIA). De este modo, los antagonistas de la IL-22, *por ejemplo*, los anticuerpos neutralizantes anti-IL-22 y los fragmentos de estos, pueden usarse para inducir la supresión inmunitaria *in vivo*, por ejemplo, para tratar trastornos autoinmunitarios (*por ejemplo*, trastornos artríticos tales como artritis reumatoide); trastornos respiratorios (*por ejemplo*, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)); condiciones inflamatorias de, *por ejemplo*, la piel (*por ejemplo*, psoriasis), sistema cardiovascular (*por ejemplo*, aterosclerosis), sistema nervioso (*por ejemplo*, enfermedad de Alzheimer), riñones (*por ejemplo*, nefritis), hígado (*por ejemplo*, hepatitis) y páncreas (*por ejemplo*, pancreatitis).

La expresión "proteínas de la célula huésped (HCP)" se refiere a las proteínas no productoras producidas por una célula huésped durante el cultivo celular o la fermentación. Como consecuencia, en algunas realizaciones, un eluato que contiene un producto tiene HCP presentes en menos de 100 partes por millón (ppm) de las HCP (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 50 ppm, o menos de aproximadamente 20 ppm). La composición de HCP es extremadamente heterogénea y depende del producto proteico y del procedimiento de purificación usado. Antes de cualquier aprobación de comercialización de un producto biológico para uso terapéutico, el nivel de proteínas contaminantes (como las HCP) en el producto debe medirse cuantitativamente de acuerdo con las pautas del ICH y la FDA.

El término "efluente de la columna" se refiere al líquido que sale de un medio o columna durante un ciclo de carga, o en el período durante el cual se aplica una carga.

B. Descripción detallada de la invención.

La presente invención proporciona procedimientos para purificar y recuperar un anticuerpo monoclonal que contiene Fc de un fluido de carga que contiene una o más impurezas mediante el uso de un procedimiento que incluye lavar un medio unido con arginina o un derivado de arginina. En una realización preferente, el medio es una columna de cromatografía de Proteína A.

En ciertas realizaciones, al menos una impureza se une al medio y/o al producto cuando el fluido de carga se carga al medio, y se usa al menos una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina para eliminar la impureza que se une al medio y/o al producto.

En la invención, la proteína purificada mediante el uso del procedimiento de la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este. Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno, y típicamente dos, dominios VH o porciones de estos, y/o al menos uno, y típicamente dos, dominios VL o porciones de estos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están interconectadas, *por ejemplo*, por enlaces de disulfuro. Los anticuerpos, o una porción de estos, pueden obtenerse de cualquier origen, que incluye, pero no se limita a, roedores, primates (*por ejemplo*, primates humanos y no humanos), camélidos, tiburones, así como producidos de forma recombinante, *por ejemplo*, quimérico, humanizado y/o generado *in vitro*, *por ejemplo*, por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de camélido o camelizado, *por ejemplo*, un dominio VHH; (vii) un Fv de cadena única (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de unión al antígeno de una inmunoglobulina fusionada a una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, estos pueden unirse, mediante el uso de procedimientos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite elaborarlos como una proteína de cadena única en la que las regiones VL y VH se hibridan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); *ver, por ejemplo*, Bird y otros (1988) Science 242:423-26; Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83). Se pretende, además, que tales anticuerpos de cadena única se abarquen dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se evalúan los fragmentos para la función de la misma manera que a los anticuerpos intactos.

En algunas realizaciones, el término "fragmento de unión al antígeno" incluye anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio único pueden incluir anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, anticuerpos modificados y andamios de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio único futuro. Los anticuerpos de dominio único pueden derivarse de cualquier especie, que incluyen, pero no se limitan a, ratones, humanos, camellos, llamas, cabras, conejos, vacas y tiburones. De acuerdo con un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único como se usa en la presente memoria es un anticuerpo de dominio único de origen natural conocido como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de las cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio único se describen, por ejemplo, en WO 9404678. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de la cadena ligera se conoce en la presente memoria, como VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de VHH puede derivarse de los anticuerpos generados en especies de Camelidae, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de la cadena ligera; tales VHH están dentro del ámbito de la invención.

Un fragmento de unión al antígeno puede incluir además, opcionalmente, una porción que mejora uno o más de, *por ejemplo*, la estabilidad, la función de la célula efectora o la fijación del complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno puede incluir además, una porción pegilada, albúmina, o una región constante de la cadena pesada y/o ligera.

A diferencia de los anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. *Ver, por ejemplo*, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y otros, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El anticuerpo o un fragmento de este puede incluir al menos una, o dos cadenas pesadas de longitud completa, y al menos una, o dos cadenas ligeras. Como alternativa, los anticuerpos o los fragmentos de estos pueden incluir solo un fragmento de unión al antígeno (*por ejemplo*, un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena única). El anticuerpo o el fragmento de este puede ser un anticuerpo monoclonal o de especificidad única. El anticuerpo o el fragmento de este puede ser además, humano, humanizado, quimérico, injertado con CDR o un anticuerpo generado *in vitro*. En otras realizaciones aún, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada seleccionada de, *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera seleccionada de, *por ejemplo*, kappa o lambda. En una realización, se altera la región constante, *por ejemplo*, se muta, para modificar las propiedades del anticuerpo (*por ejemplo*, para aumentar o disminuir uno o más de: la unión al receptor de Fc, la glucosilación de anticuerpos, el número de residuos de cisteína, la función de la célula efectora o la función del complemento). Típicamente, el anticuerpo o el fragmento de este se une específicamente a un antígeno predeterminado, por ejemplo, un antígeno asociado con un trastorno, *por ejemplo*, un trastorno neurodegenerativo, metabólico, inflamatorio, autoinmune y/o maligno. Los ejemplos de los anticuerpos que pueden separarse por los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos contra RAGE, péptido A-Beta, interleucina-13 (IL-13), interleucina-22 (IL-22), 5T4 y el factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF-8).

Las preparaciones de anticuerpos usadas con los procedimientos descritos en la presente memoria pueden provenir de varias fuentes que incluyen, pero no se limitan a, el suero de un animal inmunizado, líquido de ascitis, hibridoma o sobrenadantes de mieloma, medio de cultivo acondicionado derivado del cultivo de una línea celular recombinante que expresa la molécula del anticuerpo, o de un extracto celular de células productoras de anticuerpos. En una realización de la invención, el producto es un anticuerpo del medio de cultivo acondicionado de una línea celular recombinante productora de anticuerpos. Aunque puede haber alguna variación de línea celular a línea celular y entre

los diversos productos de anticuerpos, en base a la divulgación en la presente memoria, está dentro del alcance de un experto en esta técnica adaptar la invención en la presente memoria a una combinación particular de la proteína de anticuerpo y la línea celular productora.

5 En ciertas realizaciones, al menos una impureza se une al medio y/o al producto cuando el fluido de carga se carga al medio, y se usa al menos una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina para eliminar la impureza que se une al medio y/o al producto. En una realización de la invención, el producto purificado contiene menos del 60 % de las impurezas (*por ejemplo*, proteínas de la célula huésped), en una realización, 40 % de las impurezas, en una realización, 20 % de las impurezas, en una realización, 10 % de las impurezas, en una realización, 5 % de las impurezas, en una realización, menos del 3 % de las impurezas, y en otra realización, menos del 1 % de las impurezas. Las impurezas incluyen, pero no se limitan a, variantes de proteínas indeseables, tales como proteínas agregadas, especies de alto peso molecular, especies y fragmentos de bajo peso molecular y especies desamidadas; otras proteínas de las células huésped que secretan la proteína que se purifica; ADN de la célula huésped; componentes del medio de cultivo celular, moléculas que forman parte de un absorbente usado para la cromatografía de afinidad que se filtra en una muestra durante las etapas de purificación anteriores, *por ejemplo*, la Proteína A y la Proteína G; una endotoxina; un ácido nucleico; un virus o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

El medio usado en un procedimiento descrito en la presente memoria es una columna de cromatografía de Proteína A. Una columna de cromatografía de la Proteína A puede ser, *por ejemplo*, PROSEP-A™ (Millipore, Reino Unido), Proteína A Sepharose FAST FLOW™ (GE Healthcare, Piscataway, N.J.), Proteína A 650M TOYOPEARL™ (TosoHass Co., Filadelfia, Pa.), o columna MabSelect™ (GE Healthcare, Piscataway, N.J.).

20 Antes de poner en contacto el medio con un fluido de carga, puede ser necesario ajustar parámetros como el pH, la fuerza iónica y la temperatura y, en algunos casos, la adición de sustancias de diferentes tipos. De este modo, es una etapa opcional realizar un equilibrio del medio lavándolo con una solución (*por ejemplo*, un tampón para ajustar el pH, la fuerza iónica, etc., o para la introducción de un detergente) que aporta las características necesarias para la unión y purificación del producto.

25 En una realización de la invención, una columna de la Proteína A se equilibra y se lava con una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina, aportando de este modo, las características necesarias para purificar el producto. En una realización de la invención, la columna de Proteína A puede equilibrarse mediante el uso de una solución que contiene una sal, *por ejemplo*, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de NaPO₄, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de acetato de sodio, y aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de NaCl. El pH del tampón de equilibrio puede variar de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. En una realización, el pH del tampón de equilibrio es de aproximadamente 7,5. El tampón de equilibrio puede contener aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de Tris. En otra realización, el tampón puede contener aproximadamente 20 mM de Tris. Después de hacer contacto con el medio (*por ejemplo*, una columna de Proteína A) con el fluido de carga, se lava el medio unido. De acuerdo con la invención, la solución de lavado usada en el procedimiento descrito en la presente memoria contiene arginina o un derivado de arginina. El derivado de arginina puede ser, pero no se limita a, acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butirol-L-arginina, o N- alfa-pivaloil arginina.

40 La concentración de la arginina o del derivado de arginina en la solución de lavado es de al menos 0,5 M pero menos que 1,0 M (*por ejemplo*, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,8 M, 0,9 M). En ciertas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado es mayor que aproximadamente 0,5 M y menor que aproximadamente 1,0 M (*por ejemplo*, 0,55 M, 0,75 M). La concentración de la arginina no es 1 M.

El pH de la solución de lavado está generalmente entre 5,0 y 8,0, *por ejemplo*, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0. La solución de lavado puede contener 20 mM a 50 mM de Tris (*por ejemplo*, 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM). En una realización, el medio unido se lava con 5 volúmenes de columna de la solución de lavado, seguido de una etapa de elución.

45 En ciertas realizaciones de la invención, el producto puede eluirse de un medio lavado, *por ejemplo*, una columna de Proteína A. Para eluir un producto de una columna de Proteína A, el medio lavado se pone en contacto con un tampón de elución. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM de NaCl. En otras realizaciones, el tampón de elución puede contener arginina o derivados de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM de arginina. En realizaciones adicionales, el tampón de elución puede contener 50 mM a 150 mM de glicina. El tampón de elución puede contener, además, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM de HEPES. El tampón de elución puede contener, además, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM de ácido acético. El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0. En una realización, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 3,0.

55 El medio puede limpiarse opcionalmente, es decir, vaciarse y regenerarse, después de la elución del anticuerpo. Este procedimiento típicamente se realiza regularmente para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

Los componentes del tampón pueden ajustarse de acuerdo con el conocimiento de la persona de habilidad ordinaria en la técnica. Se proporcionan intervalos de la composición del tampón de la muestra en los Ejemplos a continuación.

No todos los tampones o etapas son necesarios, pero se proporcionan solo con fines ilustrativos. Puede usarse un tamiz de alto rendimiento, como se describe en los Ejemplos, para optimizar eficientemente las condiciones del tampón para la cromatografía en columna de Proteína A.

5 En una realización del procedimiento, el eluato incluye un producto aislado y la pureza del producto aislado aumenta en comparación con un procedimiento correspondiente en el que se usa menos de aproximadamente 0,1 M de arginina o derivado de arginina en una solución de lavado.

En otra realización, el eluato incluye un producto aislado, y la relación del producto con al menos una impureza, aumenta en comparación con un procedimiento correspondiente en el que no se usa una cantidad detectable de arginina o del derivado de arginina en una solución de lavado.

10 En algunos casos, el eluato contiene un producto, y la relación del producto con respecto a la proteína de la célula huésped, aumenta en comparación con un procedimiento correspondiente en el que se usa menos de aproximadamente 0,1 M de arginina o del derivado de arginina en una solución de lavado.

15 El eluato puede incluir un producto y la relación del producto con respecto a la proteína de la célula huésped, aumenta en comparación con un procedimiento correspondiente en el que no se usa una cantidad detectable de arginina o del derivado de arginina en una solución de lavado.

20 La turbidez proporciona una medida del producto insoluble, de las impurezas insolubles, y los complejos insolubles del producto e impurezas. La turbidez también puede ser provocada por partículas subcelulares y restos celulares. Generalmente, la menor turbidez en el eluato se asocia con una calidad más deseable del producto. La turbidez puede analizarse mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse los procedimientos nefelométricos (Baker y otros, Trends Biotechnol. abril de 2002; 20(4):149-56) o la densidad óptica. La densidad óptica generalmente se analiza midiendo la absorbancia en un intervalo de aproximadamente 320 nm a aproximadamente 650 nm.

25 En algunos casos, la turbidez del eluato se reduce en comparación con la turbidez del eluato en un procedimiento correspondiente en el que se usa menos de aproximadamente 0,1 M de arginina o del derivado de arginina en una solución de lavado. En ciertos procedimientos, la turbidez del eluato se reduce en comparación con un procedimiento correspondiente en el que no se usa una cantidad detectable de arginina o del derivado de arginina en una solución de lavado.

30 En ciertas realizaciones, el procedimiento de la presente invención da lugar a una turbidez reducida en un eluato que contiene un producto. En otras realizaciones, el procedimiento resulta en una turbidez reducida así como impurezas reducidas en el eluato que contiene el producto en comparación con un procedimiento correspondiente en el que no se usa una cantidad detectable de arginina o derivado de arginina en una solución de lavado. En ciertas realizaciones, el procedimiento no incluye el uso de ninguna filtración corriente arriba adicional, por ejemplo, una filtración adsorbente aniónica corriente arriba.

35 Aunque el procedimiento de purificación de la presente invención puede usarse solo, puede usarse en combinación con otras técnicas de purificación. En una realización, pueden usarse uno o más procesos, *por ejemplo*, para preparar un fluido de carga para reducir el reto de la carga de los contaminantes o las impurezas mientras se emplean los procedimientos descritos en la presente memoria. En algunos casos, se usan uno o más procesos para procesar el eluato, *por ejemplo*, para eliminar contaminantes o impurezas que se encuentran en el eluato.

Ejemplos

40 La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solamente para propósitos ilustrativos. Estos no deben interpretarse como limitantes del alcance o del contenido de la invención de ninguna manera.

45 Se realizaron experimentos para identificar procedimientos que son útiles para el aislamiento de un producto que es producido por una bacteria o tejido celular, en protocolos que usan un medio de afinidad como parte del proceso de aislamiento. En estos experimentos, se usó la columna de Proteína A MabSelect™ para unir el producto.

Ejemplo 1

mAb-1 anti-GDF-8: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto

50 La evaluación de diversas soluciones de lavado se realizó primero mediante el uso de un procedimiento de tamizaje de alto rendimiento (HTS). Una columna de Proteína A MabSelect™ se cargó inicialmente con medios de cultivo condicionados de un proceso de cultivo de células de Ovario de Hámster Chino ("CHO"). Después se suspendió la resina MabSelect™ y se dispensó 100 µl de la suspensión de la resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con una solución de prueba en evaluación, y posteriormente se eluyó con un tampón de pH bajo. La fracción de elución de cada pocillo se analizó para determinar

la turbidez del pico por A320 y para determinar la recuperación del producto por A280. En base a los resultados de los experimentos de HTS, se seleccionaron soluciones de prueba que produjeron la recuperación más alta y la turbidez más baja para pruebas adicionales mediante el uso de corridas de exploración de columnas a pequeña escala. En las corridas de exploración de columnas, una columna de Proteína A MabSelect se equilibró con un tampón que contenía Tris 10 mM, NaCl 100 mM pH 7,5, y se cargó con medio de cultivo acondicionado con CHO que contenía mAb-1 anti-GDF-8. La columna se enjuagó después con 5 volúmenes de columna (CV) del tampón de equilibrio, y posteriormente se lavó con 5 CV de una solución de prueba en evaluación. El producto unido se eluyó posteriormente en un tampón de pH bajo. La turbidez del pico neutralizado se midió por A320 o mediante un turbidímetro, la recuperación del producto se determinó por A280 y el nivel de las HCP se determinó mediante un ELISA. Los tamaños de la columna usados para la evaluación inicial fueron de 0,5 cm o 1,1 cm de diámetro con alturas de lecho de 8 a 25 cm. La Tabla 1 resume las condiciones de operación de la columna para todos los experimentos descritos en el Ejemplo 1.

Tabla 1: Condiciones de operación de la columna de Proteína A MabSelect™

Fase de operación de la columna	Composición de la solución	Volumen (Volúmenes de la Columna)	Velocidad lineal (cm h ⁻¹)
Equilibrio	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5	5	360/450
Carga	medio de cultivo acondicionado	NA	240
Enjuague después de la carga	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7,5	2	240
Lavado 1	Variable (ver la Tabla 2)	5	300
Enjuague previo a la elución	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7,5	5	450
Elución	NaCl 50 mM, L-arginina HCl 100 mM, pH = 3,0	6	150
Neutralización	HEPES 2M, pH = 8,0	adición 5,0 % (v/v)	-
Enjuague posterior a la elución	Tris 50 mM, pH 8,5	4	450
Vaciado	Guanidina HCl 6M	2	150
Enjuague posterior al vaciado	Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7,5	4	150/450
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v)	4	360

Para cada corrida, la columna de Proteína A MabSelect™ se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 y posteriormente se cargó a aproximadamente 35 mg de producto/ml de resina. La columna se enjuagó después con 1 volumen de columna de tampón de equilibrio y 5 volúmenes de columna (CV) del lavado de prueba en evaluación (ver la Tabla 2). La fase de lavado se siguió por un lavado de 5 CV de Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. El producto unido se eluyó después de la columna con L-arginina 100 mM, NaCl 50 mM, pH 3,0. La fracción de los productos se neutralizó posteriormente a pH 7,5 con HEPES 2 M, pH 8,0. La columna se vació con 2 CV de guanidina HCl 6 M. La guanidina se eliminó de la columna con 4 CV de Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 antes de almacenarse en etanol al 16 % (4 CV). Todas las operaciones de la columna se realizaron a temperatura ambiente.

Las diversas soluciones de lavado evaluadas para HCP y la reducción de la turbidez de la fracción del pico se enumeran en la Tabla 2. Se observó precipitación severa y pérdida de producto en la fracción de elución de Proteína A cuando se usó la solución de lavado de control de NaCl 1M (**Figura 1**). Además, la eliminación de las HCP a través de la etapa de columna de Proteína A fue menos de 1 log₁₀. En comparación con las soluciones de lavado alternativas tales como el isopropanol (IPA) al 10 %, Guanidina-HCl (GuHCl) 0,5 M, o Tris-HCl 2 M, el lavado con arginina fue más eficaz al reducir las HCP y la turbidez de la fracción de elución mientras que se mantuvo una buena recuperación del producto (**Figura 1**).

Tabla 2: Lista de soluciones de lavado evaluadas

núm.	Composición de la solución
1	NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 7,5
2	Arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
3	GuHCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
4	IPA al 10%, Tris 20 mM, pH 7,5
5	Arginina 1 M Tris 20 mM, pH 7,5
6	Arginina 1 M, acetato de sodio 20 mM, pH 5,0
7	Tris 2 M, pH 7,5

Ejemplo 2**mAb-2 anti-GDF-8: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto**

5 El medio de cultivo acondicionado de un proceso de cultivo de células CHO que contenía mAb-2 anti-GDF-8 se purificó a pequeña escala mediante el uso de una columna de Proteína A MabSelect™. Los tamaños de columna usados para la evaluación inicial fueron de 0,5 cm o 1,1 cm de diámetro con alturas de lecho de 8 cm a 25 cm. Las condiciones de operación de la Proteína A usadas para la purificación de mAb-2 anti-GDF-8, así como las soluciones de lavado evaluadas para la reducción de las HCP y de la turbidez de la fracción del pico fueron las mismas que las usadas en el Ejemplo 1 (dirigirse a la Tabla 2 para las soluciones de prueba evaluadas).

10 Se observó precipitación severa y pérdida de producto en la fracción de elución de Proteína A cuando se usó la solución de lavado de control de NaCl 1M (**Figura 2**). Además, la eliminación de las HCP a través de la etapa de columna de Proteína A fue menos de 1 log₁₀. En comparación con las soluciones de lavado alternativas, tales como isopropanol al 10 %, guanidina-HCl 0,5 M (GuHCl), o Tris-HCl 2 M, un lavado con arginina fue más eficaz para eliminar las HCP y reducir la turbidez de la fracción de elución mientras que se mantuvo >75 % de recuperación del producto (**Figura 2**).

Ejemplo 3**mAb-1 anti-IL-13: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto**

20 La evaluación de varias soluciones de lavado para la reducción de la turbidez y las HCP a través de la columna de Proteína A se realizó inicialmente mediante el uso de un procedimiento de tamizaje de alto rendimiento (HTS). Se empacó una columna de 25 ml con resina MabSelect™ y se cargó con medio de cultivo acondicionado con células CHO hasta un desafío de carga final de 25 mg de mAb-1 anti-IL-13 por ml de resina. Después se suspendió la resina y se dispensaron 100 µl de la suspensión de la resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos.

25 Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con la solución de prueba en evaluación, y el producto unido se eluyó con glicina 50 mM, NaCl 35 mM, pH 3,0. La Tabla 3 enumera todas las soluciones de lavado evaluadas en este estudio. La fracción de elución de cada pocillo se midió por A320 para determinar la turbidez del pico y A280 para determinar la recuperación del producto.

Tabla 3: Soluciones de lavado evaluadas en el Tamizaje HTS #1

Solución de Lavado	pH	Concentración
NaCl - Control	7,5	0,15 - 3,5 M
Tween 80 con NaCl 150 mM	7,5	0,05 - 1,0 %
Guanidina HCl	7,5	0,1 - 2,0 M
CTAB*	7,5	0,1 - 1,0 %

Solución de Lavado	pH	Concentración
Alcohol Isopropílico (IPA)	7,5	1,0 - 10,0 %
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	7,5	0,05 - 0,7 %
Propilenglicol	7,5	5,0 - 40,0
Propilenglicol (pH bajo)	5,0	2,0 - 20,0 %
Propilenglicol (pH bajo)	6,0	5,0 - 30,0 %
Tween 80 con NaCl 0,5 M	7,5	0,05 - 1,0 %
CHAPS**	7,5	0,05 - 1,0 %
Urea	7,5	0,1 - 2,0 M
Sulfato de Sodio	7,5	0,1 - 0,8 M
Sacarosa	7,5	1,0 - 10,0 %
Glicina	7,5	0,1 - 1,0 M
Glicerol	7,5	1,0 - 10,0 %
CaCl ₂	7,5	0,25 - 2,5 M
CaCl ₂ (pH bajo)	6,0	0,1 - 1,75 M
CaCl ₂ (pH bajo)	5,0	0,1 - 1,75 M
Arginina	7,5	0,1 - 1,0 M
Arginina (pH bajo)	6,0	0,1 - 1,0 M
Arginina (pH bajo)	5,0	0,1 - 1,0 M
Tris	7,5	1 - 2M
*Bromuro de cetiltrimetilamonio, cargado (1 mM = CMC) **3-[(3-Colamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propano sulfonato		

La eficacia de la solución de lavado en evaluación se evaluó comparando los valores normalizados de A320 de las fracciones de elución neutralizadas. Cinco soluciones de prueba, Arginina, CaCl₂, guanidina HCl, IPA y Tris fueron más eficaces que el lavado de control con NaCl 1 M en la reducción de los valores de turbidez de la fracción del pico neutralizada. La Arginina, CaCl₂, Tris e IPA se probaron adicionalmente mediante el uso de corridas de exploración de columnas a pequeña escala. Se usaron columnas de 1,1 cm (diámetro) x 8 cm (altura del lecho) para estas evaluaciones. El medio de cultivo acondicionado del cultivo de células CHO que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó a pequeña escala mediante el uso de una columna de Proteína A MabSelect™ que se operó a temperatura ambiente. El desafío de carga se fijó a 30 mg/ml de resina para estas corridas. Las condiciones de operación usadas para las corridas de exploración se resumen en la **Tabla 4**. Brevemente, la columna de Proteína A MabSelect™ se equilibró y cargó con medio de cultivo acondicionado con células CHO que contenían mAb-1 anti-IL-13. Después se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de un tampón con alto contenido de sal seguido de 5 volúmenes de columna de la solución de lavado en evaluación. La columna se lavó después con una serie de soluciones de bajo contenido de sal en la preparación para la etapa de elución. El producto unido se eluyó después con glicina 50 mM, NaCl 15 mM, pH 3,0. La turbidez del pico neutralizado se midió mediante un turbidímetro, la recuperación del producto se determinó por A280 y el nivel de las HCP se determinó mediante ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la **Figura 3**.

Tabla 4: Condiciones de operación usadas para las corridas de exploración

Operación	Composición de la solución	Volúmenes de columna (CV)	Tasa de flujo (cm h ⁻¹)
Equilibrio	NaCl 150 mM, Tris 20 mM; pH = 7,5	5	300
Carga	medio de cultivo acondicionado	-	300
Enjuague posterior a la carga	NaCl 1,0 M, Tris 20 mM; pH = 7,5	5	300
Lavado	Solución de prueba	5	300
Enjuague previo a la elución 1	NaCl 35 mM, Tris 50 mM; pH = 7,5	5	300
Enjuague previo a la elución 2	NaCl 5 mM, Tris 10 mM; pH = 7,5	5	300
Elución	NaCl 15 mM, glicina 50 mM; pH = 3,0	5 (volumen del pico de 3CV)	300
Vaciado	guanidina HCl 6,0 M	5	300
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v)	5	300
Neutralización	Tris 2,0 M; pH 8,5	1 % (v/v)	300

Los valores de turbidez de la fracción del pico neutralizada cuando se usó la solución de lavado de control de NaCl 1 M es ~20 NTU, y es significativamente menor que los informados en los Ejemplos 1 y 2. La Arginina, el CaCl₂, y el Tris fueron más eficaces en la reducción de la turbidez de la fracción del pico neutralizada en comparación con el control de NaCl 1 M. Sin embargo, de las tres soluciones de lavado que fueron eficaces en la reducción de la turbidez de la fracción del pico neutralizada, la arginina fue más eficaz en la reducción de las HCP sin afectar la recuperación del producto. La reducción de las HCP a través de la etapa de Proteína A MabSelect™ con arginina 0,4 M, lavado con pH 5,0 fue 3,5 veces superior a los valores correspondientes con el lavado de control NaCl 1 M (**Figura 3**).

10 **Ejemplo 4**

mAb anti-IL-22: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto

La evaluación de varias soluciones de lavado para la reducción de la turbidez y de las HCP a través de la columna de Proteína A se realizó inicialmente mediante el uso de un procedimiento de HTS. Una columna de 25 ml se empacó con resina MabSelect™ y se cargó con medios acondicionados con células CHO hasta un desafío de carga final de 25 mg de mAb anti-IL-22 por ml de resina. Después se suspendió la resina y se dispensaron 100 µl de la suspensión de la resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con la solución de prueba en evaluación, y el producto unido se eluyó con un tampón de pH bajo. Las fracciones de elución se neutralizaron después con un tampón de pH alto y se ensayaron para determinar la turbidez del pico por A320 y para determinar la recuperación de producto por A280. En base a los resultados de los experimentos de HTS, las soluciones de prueba que produjeron la recuperación más alta y la turbidez más baja se seleccionaron para pruebas adicionales mediante el uso de corridas de exploración de columnas a pequeña escala, cuyas condiciones se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de prueba para corridas de exploración de columnas

	Condiciones de prueba
Corrida 1	Lavado: Tris 2 M, pH 7,5 Elución: Glicina 50 mM, NaCl 20 mM, pH 3,0 Neutralización: HEPES 2 M, pH 8,0
Corrida 2	Lavado: Arginina 0,5 M, Tris 50 mM, pH 7,5 Elución: Glicina 50 mM, NaCl 20 mM, pH 3,0 Neutralización: HEPES 2 M, pH 8,0
Corrida 3	Lavado: Tris 2 M, pH 7,5 Elución: HEPES 25 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0 Neutralización: HEPES 2 M, pH 8,0

	Condiciones de prueba
Corrida 4	Lavado: Tris 2 M, pH 7,5 Elución: Arginina 100 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0 Neutralización: HEPES 2 M, pH 8,0
Corrida 5	Lavado: Tris 2 M, pH 7,5 Elución: Glicina 50 mM, NaCl 20 mM, pH 3,0 Neutralización: Tris-base 2 M

5 Para cada corrida, la columna de Proteína A MabSelect™ de 0,5 cm (d) x 20 cm (h) se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 y posteriormente se cargó a aproximadamente 35 mg de producto/ml de resina. La columna se lavó después con 5 CV de la solución de prueba. La fase de lavado se siguió por un enjuague previo a la elución 3 CV de Tris 5 mM, NaCl 20-30 mM, pH 7,5. El producto unido se eluyó después de la columna con un tampón de pH bajo y se neutralizó a pH 7,5 con una solución de prueba. La columna se vació con 5 CV de NaOH 50 mM, sulfato de sodio 500 mM y se almacenó en 5 CV de etanol al 16 % (v/v), Tris 50 mM, pH 7,5. Todas las operaciones de la columna se realizaron a temperatura ambiente y se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Condiciones de operación para las corridas de exploración de columna

Operación	Composición de la Solución	Volúmenes de columna (CV)	Tasa de flujo (cm h ⁻¹)
Equilibrio	NaCl 150 mM, Tris 20 mM; pH 7,5	5	300
Carga	medio de cultivo acondicionado	-	300
Lavado	Solución de prueba (ver la Tabla 5)	5	300
Enjuague previo a la elución	NaCl 20-30 mM, Tris 5 mM; pH 7,5	3	300
Elución	Solución de prueba (ver la Tabla 5)	5 (volumen del pico de 3CV)	300
Vaciado	NaOH 50 mM, sulfato de sodio 500 mM	5	300
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v), Tris 50 mM, pH 7,5	5	300
Neutralización	Solución de prueba (ver la Tabla 5)		300

10 Como se muestra en la **Figura 4**, todas las condiciones de prueba resultaron en recuperaciones comparables de producto. El lavado con arginina usado en la Corrida 2 y el lavado con Tris usado en la Corrida 5 proporcionaron la mayor reducción de las HCP. Sin embargo, el lavado con arginina usado en la Corrida 2 tuvo un nivel de turbidez casi 2 veces menor que el lavado con Tris usado en la Corrida 5.

15 **Ejemplo 5**

mAb anti-RAGE: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto

La evaluación de varias soluciones de lavado para la reducción de la turbidez y de las HCP a través de la columna de Proteína A se realizó inicialmente mediante el uso de un procedimiento de HTS. Una columna de 25 ml se empacó con resina MabSelect™ y se cargó con medio de cultivo acondicionado con células CHO hasta un desafío de carga final de 25 mg de mAb anti-RAGE por ml de resina. Después se suspendió la resina y se dispensaron 100 µl de la suspensión de la resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con la solución de prueba en evaluación, y el producto unido se eluyó con un tampón de pH bajo. Las fracciones de elución se neutralizaron después con un tampón de pH alto y se ensayaron para determinar la turbidez del pico por A320 y para determinar la recuperación de producto por A280. El experimento HTS dio como resultado una recuperación y turbidez aceptables para la mayoría de las soluciones probadas. En base a estos resultados y la experiencia previa, se evaluó la arginina y se eligió como la condición de lavado para este producto.

30 La columna de Proteína A MabSelect™ de 5 cm (d) x 23 cm (h) se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 y posteriormente se cargó a aproximadamente 35 mg de producto/ml de resina. La columna se lavó después con 5 CV de Arginina 0,5 M, Tris 50 mM, pH 7,5. La fase de lavado fue seguida por un enjuague previo a la elución 3 CV de NaCl 39 mM, Tris 5 mM, pH 7,5. El producto unido se eluyó después de la

columna con NaCl 22 mM, Glicina 50 mM, pH 3,0 y se neutralizó a pH 7,5 con Tris 2,0 M, pH 8,2. La columna se vació con 5 CV de NaOH 50 mM, sulfato de sodio 500 mM y se almacenó en 5 CV de etanol al 16 % (v/v), Tris 50 mM, pH 7,5. Todas las operaciones de la columna se realizaron a temperatura ambiente y se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Condiciones de operación para las corridas de exploración de columna

Operación	Composición de la solución	Volúmenes de columna (CV)	Tasa de flujo (cm h ⁻¹)
Equilibrio	NaCl 150 mM, Tris 20 mM; pH 7,5	5	300
Carga	medio de cultivo acondicionado	=	300
Lavado	Arginina 0,5M, Tris 50 mM, pH 7,5	5	300
Enjuague previo a la elución	NaCl 39 mM, Tris 5 mM; pH 7,5	3	300
Elución	NaCl 22 mM, Glicina 50 mM; pH 3,0	5 (volumen del pico de 3CV)	300
Vaciado	NaOH 50 mM, sulfato de sodio 500 mM	5	300
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v), Tris 50 mM, pH 7,5	5	300
Neutralización	Tris 2,0 M, pH 8,2	0,9 % (v/v)	300

5

Como se muestra en la **Figura 5**, el lavado con arginina dio como resultado un recuperación aceptable de producto, mientras que proporcionó niveles deseables de eliminación de las HCP y reducción de la turbidez del pico neutralizado.

Ejemplo 6

10 mAb anti-A-Beta: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto

La evaluación de diversas soluciones de lavado se realizó primero mediante el uso de un procedimiento de tamizaje de alto rendimiento (HTS). Una columna de Proteína A MabSelect se cargó inicialmente con medios acondicionados a partir de un proceso de cultivo de células de Ovario de Hámster Chino (CHO). Después se suspendió la resina MabSelect y se dispensaron 100 µl de la suspensión de resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con una solución de prueba en evaluación (ver la **Tabla 8**), y posteriormente se eluyó con un tampón de pH bajo. La fracción de elución de cada pocillo se analizó para determinar la turbidez del pico por A320 y para determinar la recuperación del producto por A280. En base a los resultados de los experimentos HTS, las soluciones de prueba que produjeron la recuperación más alta y la eliminación de HCP más alta se seleccionaron para pruebas adicionales mediante el uso de corridas de la columna a pequeña escala. Estas soluciones de lavado fueron Arginina y CaCl₂.

20

Tabla 8: Soluciones de lavado de HTS probadas

Excipiente de lavado	Concentración
NaCl	0,5M, 1,0M, 1,5M, 2,0M
Arginina	0,5M, 1,0M, 1,5M, 2,0M
CaCl ₂	0,5M, 1,0M, 1,5M, 2,0M
Tris	0,5M, 1,0M, 1,5M, 2,0M

25 En las corridas de la columna, se usó una columna de 1,6 cm (diámetro) x 15 cm (altura del lecho) para estas evaluaciones. La columna de Proteína A MabSelect se equilibró con un tampón que contuvo Tris 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,5, y se cargó con medio acondicionado de células CHO que contenía mAb anti-A-Beta a 40 mg/ml. Después

5 se enjuagó la columna con 2 volúmenes de columna (CV) del tampón de equilibrio, y posteriormente se lavó con 5 CV de Arginina o CaCl₂. La columna se lavó después con Tris 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5 en preparación para la etapa de elución. El producto unido se eluyó posteriormente con glicina 50 mM, NaCl 10 mM pH 3,0. La turbidez del pico neutralizado se midió por A320 o mediante un turbidímetro, la recuperación del producto se determinó por A280 y el nivel de las HCP se determinó mediante un ELISA. La **Tabla 9** resume las condiciones de operación de la columna para todos los experimentos descritos en este Ejemplo.

Tabla 9: Condiciones de operación de la columna de Proteína A

Operación de la columna	Composición de la solución	Volumen (CV)	Velocidad Lineal (cm/h)
Equilibrio	Tris 50 mM, NaCl 0,15M; pH = 7,5	5	< 300
Carga	medio de cultivo acondicionado	NA	< 300
Enjuague posterior a la carga	Tris 50 mM, NaCl 0,15M; pH = 7,5	2	< 300
Lavado 1:	Tris 50mM pH 7,5 p/	5	< 300
	Arginina 0,5M		
	Arginina 1,0M		
	CaCl ₂ 0,5M		
	CaCl ₂ 1,0M		
Lavado 2	Tris 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 7,5	5	< 300
Elución	Glicina 50 mM, NaCl 10 mM pH 3,0	4	< 300
Neutralización	Hepes 2M pH 8,5 o Tris 2M pH 9,0	~1%	< 300
Vaciado	NaOH 50 mM, sulfato de sodio 0,5M	5	< 300
Lavado del vaciado	Tris 50 mM, NaCl 0,15M; pH = 7,5	5	< 300
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v)		< 300

Tabla 10: Datos de la Proteína A para estudios de lavado

Condiciones de lavado	% de recuperación por A280	ppm de HCP
Arginina 0,5 M	87	9.300
Arginina 0,5 M	87	12,700
CaCl ₂ 0,5 M	86	9.000
CaCl ₂ 0,5 M	80	10,600
CaCl ₂ 1,0 M	80	11,500

10 La **Tabla 10** muestra los resultados de recuperación y los valores de HCP para los experimentos de lavado para mAb anti-A-Beta. La arginina y el CaCl₂ fueron soluciones de lavado comparables para la reducción de la proteína de la célula huésped y la turbidez de la fracción del pico final. Se eligió Arginina 0,5 M como la solución de lavado para el proceso con mAb anti-A-Beta en base a la menor pérdida de producto durante el lavado.

15 **Ejemplo 7**

mAb-2 anti-IL-13: Comparación de tampones de lavado de Proteína A para la reducción de las HCP y de la turbidez y la recuperación de producto

20 La evaluación de varias soluciones de lavado para la reducción de la turbidez en la columna de Proteína A se realizó inicialmente mediante el uso de un procedimiento de tamizaje de alto rendimiento (HTS). Una columna de 25 ml se empacó con resina MabSelect™ y se cargó con medio acondicionado de CHO hasta un desafío de carga final de 50 mg de mAb-2 anti-IL-13 por ml de resina. Después se suspendió la resina y se dispensaron 100 µl de la suspensión de resina en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después se lavó cada pocillo de la placa de microtitulación con una solución de prueba en evaluación, se eluyó el producto unido y se neutralizó la fracción de elución ácida.

Para el HTS, varios lavados de excipientes, tampones de elución y titulantes, se utilizaron combinatoriamente y con concentraciones variables. Los lavados de excipientes usados en el HTS fueron cloruro de calcio, cloruro de sodio, Tris, y arginina. Los tampones de elución utilizados en el HTS fueron glicina, HEPES y ácido acético junto con concentraciones diversas de NaCl. Los titulantes usados en el HTS fueron Tris, HEPES e Imidazol.

5 Mediante el uso de A320 como sustituto de la precipitación, se evaluó la eficacia de las soluciones de lavado comparando los valores normalizados de A320 de las fracciones de elución neutralizadas. La arginina demostró ser más eficaz para la reducción de las lecturas A320 del pico eluido. En base a los resultados de los experimentos de HTS, se seleccionaron soluciones de prueba que produjeron la recuperación más alta y la turbidez más baja para pruebas adicionales mediante el uso de corridas de exploración de columnas a pequeña escala. Esto condujo a pruebas adicionales de cloruro de calcio, arginina, y cloruro de sodio (control) como tampones de lavado en ensayos de la columna a pequeña escala.

15 El medio de cultivo acondicionado a partir de un proceso de cultivo CHO que contenía mAb-2 anti-IL-13 se purificó a pequeña escala mediante el uso de una columna de Proteína A MabSelect™ operada a temperatura ambiente. Los tamaños de la columna usados para la evaluación inicial fueron de 1,1 cm de diámetro con alturas de lecho de 20 cm a 25 cm. El desafío de carga se fijó a 35 mg/ml de resina para estas corridas. Las condiciones usadas para las corridas de exploración se resumen en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Condiciones de operación usadas para las corridas de exploración

Operación	Composición de la solución	Volúmenes de columna (CV)	Tasa de flujo (cm h ⁻¹)
Equilibrio	NaCl 150 mM, Tris 50 mM; pH = 7,5	5	300
Carga	medio de cultivo acondicionado	-	240
Enjuague posterior a la carga	NaCl 150 mM, Tris 50 mM; pH = 7,5	5	300
Lavado	Solución de prueba (ver la Tabla 12)	5	300
Enjuague previo a la elución	Tris 10 mM, concentración de NaCl igual al tampón de elución, pH = 7,5	3	300
Elución	Ver la Tabla 13	6 CV (volumen del pico de 3 CV)	300
Vaciado	NaOH 50 mM, sulfato de sodio 500 mM	5	180
Almacenamiento	etanol al 16 % (v/v), Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5	5	300
Neutralización	Ver la Tabla 13	~1-5 % (v/v)	

20

Tabla 12: Lista de soluciones de lavado evaluadas

Referencia	Composición de la solución
1	Arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
2	Cloruro de calcio 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
3	Cloruro de sodio 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
4	Arginina 2,0 M, Tris 20 mM, pH 7,5
5	Cloruro de calcio 1,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5
6	Arginina 1,0 M, Tris 20 mM, pH 7,5
7	Cloruro de calcio 1,0 M, Tris 20 mM, pH 7,5
7	Arginina 2,0 M, Tris 20 mM, pH 7,5

Tabla 13: Lista de tampones de elución y titulación empleados

Referencia	Tampón de Elución
A	Glicina 50 mM, NaCl 20 mM, pH 3,1
B	Glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 3,1
C	Ácido acético 50 mM, NaCl 20 mM, pH 3,1
	Titulante
D	Tris 2,0 M, pH 9,0
E	HEPES 2,0 M, pH 9,0
F	Imidazol 1,0 M, pH 8,0

5 En resumen, la columna de Proteína A MabSelect™ se equilibró y se cargó con medio acondicionado CHO que contenía mAb-2 anti-IL-13. Después se lavó la columna con 5 CV de un tampón de contenido de sal moderado seguido de 5 CV de la solución de lavado en evaluación. Después se lavó la columna con 3 CV de una solución de bajo contenido de sal en la preparación para la etapa de elución. El producto unido se eluyó después con una solución que contenía ya sea glicina o ácido acético como la especie tampón con un pH de 3,1. Esta fracción del pico se neutralizó después independientemente con tres titulantes diferentes. La turbidez del pico neutralizado se midió con un turbidímetro, la recuperación del producto se midió por A280, y el nivel de las HCP se cuantificó con ELISA. Los resultados de este experimento se resumen en la **Figura 6**.

10 En cada concentración ensayada y con varios tampones de elución (ver la **Tabla 13**), se descubrió que la arginina es más eficaz que el cloruro de calcio o el cloruro de sodio en la reducción de la turbidez de la fracción del pico ácida y neutralizada. Este hallazgo fue consistente ya sea si las fracciones ácidas se neutralizaron con Tris, HEPES o titulante de imidazol (ver la **Tabla 13**).

15 Además, se demostró que el efecto de un lavado con arginina no se limitó a un pH final discreto de la fracción neutralizada. En un intervalo de pH de 7,5-8,2 (*por ejemplo*, 7,5, 7,7, 7,9, 8,0, 8,1 y 8,2), los valores de turbidez del pico neutralizado disminuyen a medida que aumenta el pH. Sin embargo, en este mismo intervalo, el empleo del lavado con arginina siempre dio como resultado un NTU menor que si se usara cloruro de calcio.

20 La recuperación del producto cargado fue >95 % para cada lavado de excipiente ensayado. Los datos de HTS indicaron que se obtendría una recuperación notablemente menor al lavar con >1,5 M de cloruro de calcio, por lo que esta concentración no se ensayó.

25 Las especies de lavado examinadas no pudieron diferenciarse en base a la concentración final de HCP, HMW, y Proteína A en la fracción del pico. Sin embargo, un análisis de la fracción de lavado eluida con un lavado con arginina 1,0 M reveló consistentemente niveles significativos de HCP. Los niveles de HCP en la fracción de lavado fueron de ~49.000 ppm mientras solo de ~22.000 ppm en el pico. Esto es evidencia de que el lavado con arginina elimina selectivamente las HCP.

30 Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y así sucesivamente usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones se entenderán como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente." Como consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades que buscan ser obtenidas por la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y técnicas de redondeo ordinarias.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar un anticuerpo monoclonal que contiene Fc, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) proporcionar un fluido de carga que comprende dicho anticuerpo y una o más impurezas;
 - 5 (b) poner en contacto el fluido de carga con un medio, en el que dicho medio es una columna de cromatografía de Proteína A, y en el que el anticuerpo se une al medio en condiciones adecuadas, proporcionando de ese modo un medio unido;
 - (c) poner en contacto el medio unido con una primera solución de lavado a través del medio unido, en el que dicha primera solución de lavado comprende arginina o un derivado de arginina seleccionado de acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butirol-L-arginina, N-alfa-pivaloil arginina, a una concentración de al menos 10 0,5 M pero menos de 1,0 M, y en el que el pH de la solución de lavado está entre 5,0 y 8,0, proporcionando de ese modo un medio de lavado;
 - (d) poner en contacto el medio de lavado con una solución de elución en condiciones adecuadas para eluir el anticuerpo generando de ese modo un eluato que comprende el anticuerpo, y
 - (e) recoger el eluato que comprende el anticuerpo.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además
 - (f) neutralizar el eluato,
 - en el que se aumenta la relación del anticuerpo con respecto a al menos una impureza en el eluato, y el eluato tiene una turbidez reducida en comparación con un procedimiento correspondiente en el que no se usa arginina o el derivado de arginina detectable en una solución de lavado.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además poner en contacto el medio unido con una segunda solución de lavado después de la etapa (c).
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha segunda solución de lavado es diferente de la primera solución de lavado.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que la segunda solución de lavado no comprende arginina.
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución de elución comprende cloruro de sodio; arginina; un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en: acetil arginina, agmatina, ácido argínico, N-alfa-butirol-L-arginina, N-alfa-pivaloil arginina; glicina; HEPES; o ácido acético.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución de elución tiene un pH de entre 2 y 4.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa (a), al menos una impureza se une al anticuerpo; y en el que en la etapa (c), poner en contacto el medio unido con dicha primera solución de lavado elimina dicha impureza que se une al anticuerpo.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento no comprende una filtración adsorbente aniónica corriente arriba.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es específico para GDF-8, IL-13, IL-22, RAGE o A-Beta.
- 40 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha impureza comprende una proteína de la célula huésped, un ácido nucleico, una endotoxina, la Proteína A, la Proteína G, un virus o un fragmento de este, un componente del medio de cultivo celular, una variante de anticuerpo unida bajo disulfuro, una variante de anticuerpo de bajo peso molecular, una variante de anticuerpo de alto peso molecular, una variante de anticuerpo truncada, o una variante de anticuerpo mal plegada.

Figura 1

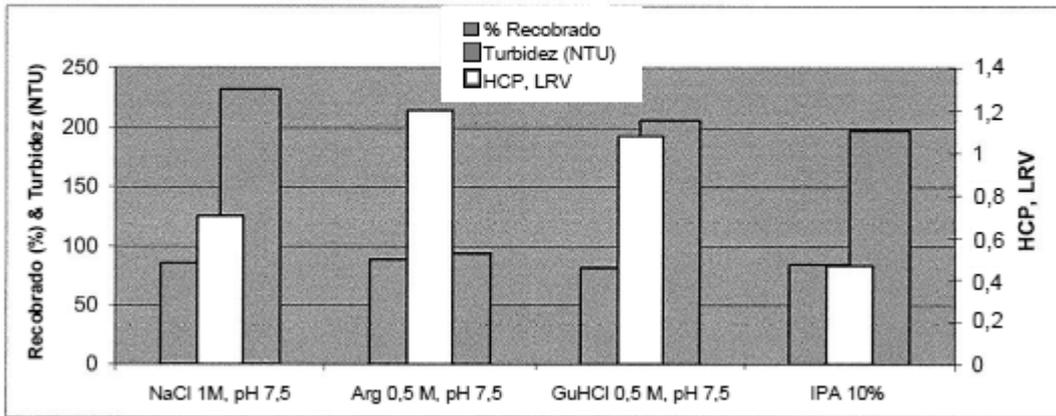


Figura 2

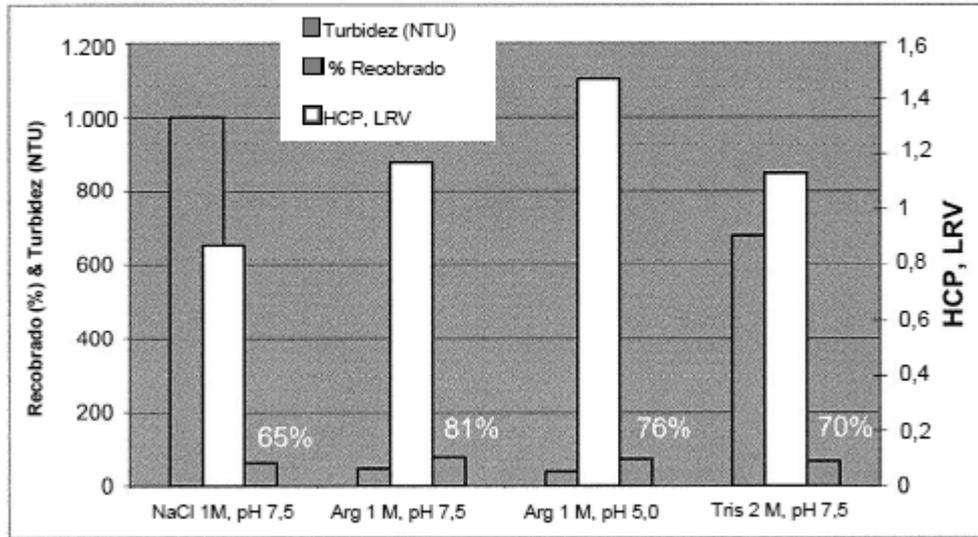


Figura 3

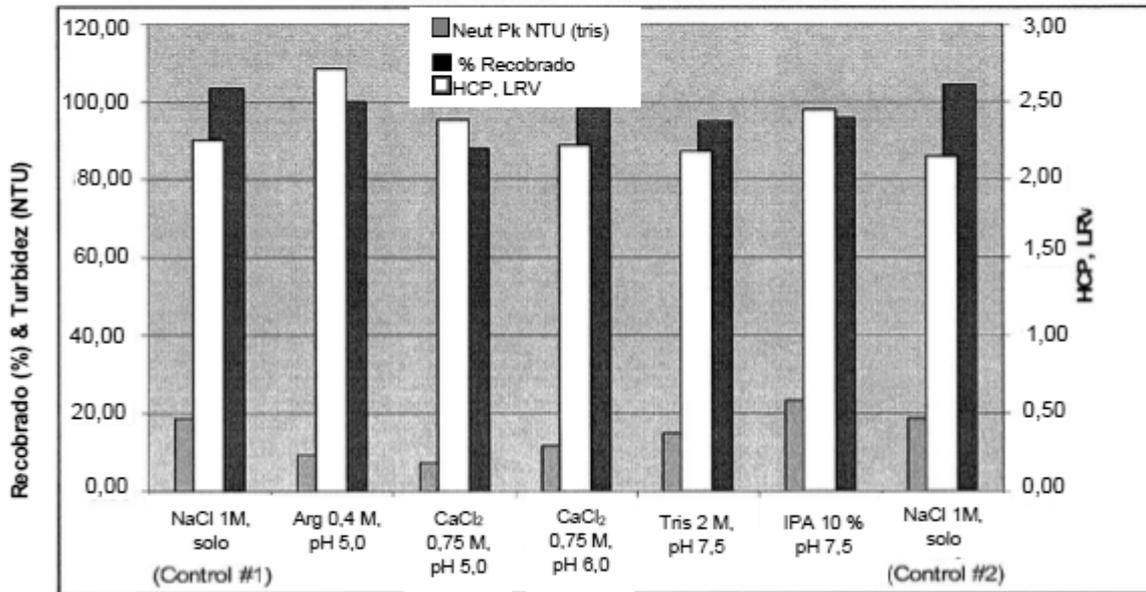


Figura 4

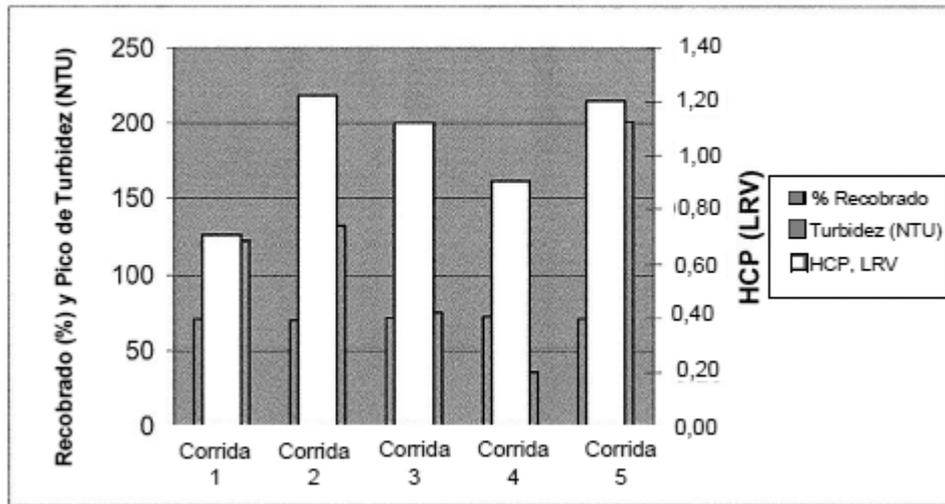


Figura 5

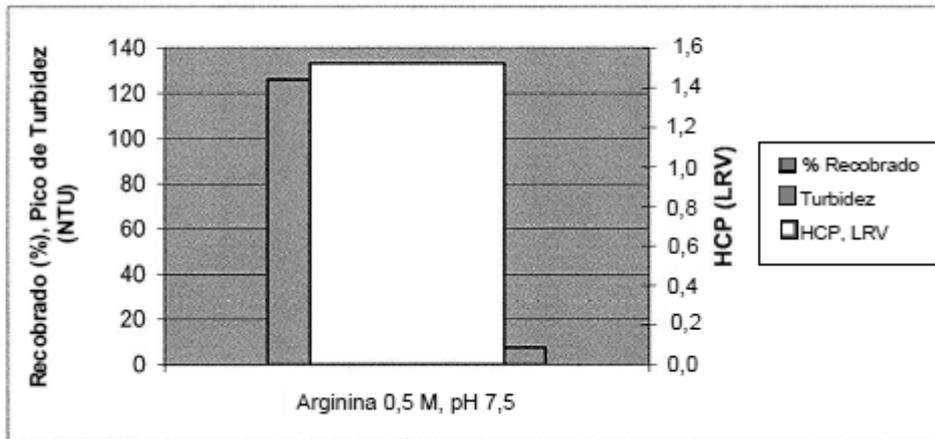


Figura 6

