

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 206**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/20** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/IB2014/059755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14713926 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2969098**

54 Título: **Procedimientos de purificación de anticuerpos**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361787309 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2020**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY  
(NO. 2) LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9SG, GB**

72 Inventor/es:

**GOKLEN, KENT E.;  
SUDA, ERIC J. y  
UBIERA, ANTONIO RAUL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 765 206 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

Procedimientos de purificación de anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la purificación de proteínas usando Proteína A, Proteína G o Proteína L inmovilizadas en un soporte sólido. En particular, la invención se refiere a componentes de tampón de lavado y procedimientos para usar los tampones de lavado para eliminar los contaminantes de la célula huésped durante las etapas de lavado, minimizando la pérdida del producto proteico deseado.

**Antecedentes de la invención**

En la última década, la cromatografía de afinidad de Proteína A se ha establecido como el principal procedimiento de elección para la captura de anticuerpos monoclonales (mAb) de las corrientes de alimentación de cultivos celulares de mamíferos. Esta etapa de afinidad altamente específica es capaz de eliminar el 98 % de las impurezas en una sola etapa debido a la unión específica entre el ligando de la Proteína A y la región Fc del anticuerpo. Bajo condiciones de operación típicas en la cromatografía de Proteína A, las corrientes de alimentación de cultivo celular clarificadas se aplican a la columna hasta que se alcanza una cierta carga de masa de anticuerpo. Luego, la columna se lava típicamente con un tampón de alta fuerza iónica, un agente caotrópico, un modificador hidrófobo o un detergente (véase el documento WO2007109163) para eliminar los contaminantes de la célula huésped unidos a la resina a través de interacciones no específicas. El anticuerpo se eluye normalmente de la columna mediante un cambio en el pH y se recoge para su posterior procesamiento. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es investigar el uso de detergentes combinados con sales para romper las interacciones iónicas e hidrófobas y mejorar la eliminación de los contaminantes de la célula huésped, reduciendo así la carga de purificación en las operaciones unitarias posteriores.

Para la purificación a gran escala, se hace mucho esfuerzo en optimizar los componentes de los tampones de lavado y elución para maximizar el rendimiento del producto. Sin embargo, en una situación de producción en la que se purifican muchos productos proteicos diferentes al mismo tiempo, el desarrollo de un tampón de lavado único para cada producto proteico individual requiere un tiempo significativo y recursos para cribar varios componentes del tampón para determinar un tampón de lavado apropiado para cada producto proteico particular. Sería útil y deseable un tampón de lavado intermedio "genérico" que pudiera usarse eficazmente con diferentes tipos de proteínas. La presente invención proporciona un procedimiento de purificación de proteínas usando tales componentes del tampón de lavado.

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para purificar una proteína de una solución que contiene al menos una impureza del proceso que comprende: a) adsorber la proteína a la Proteína A, Proteína G o Proteína L inmovilizada sobre un soporte sólido; b) eliminar al menos una impureza del proceso poniendo en contacto el soporte sólido que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende un carboxilato alifático en el que dicho carboxilato alifático comprende una cadena principal de 6-12 carbonos; y c) eluir la proteína del soporte sólido, en el que la solución es una corriente de alimentación de cultivo celular, en la que al menos una impureza del proceso es una proteína de la célula huésped o ADN de la célula huésped, en la que la proteína se selecciona de uno de: anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, scFv unido a disulfuro o diacuerpo, y en el que el carboxilato alifático se selecciona de uno de: caproato, heptanoato, caprilato y decanoato, y en el que la fuente del carboxilato alifático se selecciona de un ácido carboxílico alifático, una sal de sodio de un ácido carboxílico alifático y una sal de potasio de un ácido carboxílico alifático, en el que la concentración de caprilato de sodio está entre 50 y 125 mM.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento como se describe anteriormente que comprende:

- (a) equilibrar una Proteína A inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína A;
- (b) adsorber la proteína de la solución a la Proteína A inmovilizada en la fase sólida;
- (c) eliminar al menos una impureza del proceso lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína A que comprende una base tris 50 mM a 55 mM, ácido acético 45 mM a 55 mM, al menos un carboxilato alifático, a un pH de 7,2 a 8,0, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio 100 mM y decanoato de sodio 20 mM; y
- (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína A, en el que todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl.

El tampón de lavado de Proteína A puede comprender además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. El tampón de lavado de Proteína A puede comprender acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento como se describió anteriormente que comprende:

- (a) equilibrar una Proteína L inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína L;  
 (b) adsorber la proteína de la solución a la Proteína L inmovilizada en la fase sólida;  
 (c) eliminar al menos una impureza del proceso lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína L que comprende una base tris 50 mM a 55 mM, ácido acético 45 mM a 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a pH 7,5, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio 100 mM y decanoato de sodio 20 mM; y  
 (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína L, en el que todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl.

El tampón de lavado de Proteína L puede comprender además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. El tampón de lavado de Proteína L puede comprender acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1.: Resultados del estudio de concentración de caprilato - anti-OSM.  
 Fig. 2.: Resultados del estudio de concentración de caprilato - anti-IL13.  
 Fig. 3.: Resultados del estudio comparativo de ácido carboxílico.

### Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que esta invención no se limita a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir procedimientos particulares solamente, y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias al plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye una combinación de dos o más polipéptidos, y similares.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , incluyendo  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ , y  $\pm 0.1\%$  del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos divulgados.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en este documento se puede usar en la práctica para probar la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Un polipéptido puede ser de origen natural (derivado de tejido), expresión recombinante o natural a partir de preparaciones celulares procariontas o eucariotas, o producirse químicamente mediante procedimientos de síntesis. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y a los polímeros de aminoácidos no naturales. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural. Los residuos no naturales están bien descritos en la literatura científica y de patentes; a continuación se describen algunos ejemplos de composiciones no naturales útiles como miméticos de residuos de aminoácidos naturales y directrices. Los miméticos de aminoácidos aromáticos pueden generarse reemplazándolos, por ejemplo, con D o L-naftilalanina; D o L-fenilglicina; D o L-2 tienilalanina; D o L-1, -2,3- o 4-pirenilalanina; D o L-3-tienilalanina; D o L-(2-piridinil)-alanina; D o L-(3-piridinil)-alanina; D o L-(2-pirazinil)-alanina; D o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D o L-p-bifenilfenilalanina; K o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D o L-2-indol(alquil)alaninas; y, D o L-alquilaminas, en las que alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isobutilo, iso-pentilo sustituido o no sustituido, o aminoácidos no ácidos. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y anillos aromáticos de piridilo.

"Péptido" como se usa en el presente documento incluye péptidos que son variaciones conservadoras de esos péptidos específicamente ejemplificados en el presente documento. "Variación conservadora" como se usa en el presente documento denota el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por

otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, y similares. Los aminoácidos hidrofílicos neutros que pueden sustituirse por otro incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. "Variación conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, siempre que los anticuerpos generados para el polipéptido sustituido también reaccionen de manera inmune con el polipéptido no sustituido. Dichas sustituciones conservadoras están dentro de la definición de las clases de los péptidos de la invención. "Catiónico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier péptido que posee una carga neta positiva a pH 7,4. La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento.

"Recombinante" cuando se usa con referencia a una proteína indica que la proteína ha sido modificada por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa.

Como se usa en el presente documento, una "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína y/o polipéptido que puede administrarse a un mamífero para provocar una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que se busca, por ejemplo, por un investigador o médico. Una proteína terapéutica puede provocar más de una respuesta biológica o médica. Además, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado, pero no se limita a, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal, así como cantidades efectivas para causar una función fisiológica en un paciente que mejora o ayuda en el efecto terapéutico de un segundo agente farmacéutico.

Todos los residuos de "aminoácidos" identificados en el presente están en la configuración L natural. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos estándar, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

1 Letra	3 Letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
s	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

Debe observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácidos están representadas aquí por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional del terminal amino al terminal carboxilo.

La proteína es un polipéptido de unión a antígeno. El polipéptido de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, scFv unido a disulfuro o diacuerpo.

El término "polipéptido de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros constructos de proteína que son capaces de unirse a un antígeno.

Los términos Fv, Fc, Fd, Fab o F(ab)<sub>2</sub> se usan con sus significados estándar (véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado genéticamente que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadenas pesadas) derivada de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado genéticamente que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula se derivan de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, los residuos de soporte del marco pueden ser alterados para preservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT.RTM, la base de datos de Los Alamos y la base de datos Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones marco del anticuerpo donante (sobre una base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones marco constantes o variables de la cadena ligera se puede seleccionar de manera similar. Cabe señalar que no se requiere que las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo aceptor se originen a partir del mismo anticuerpo aceptor. El estado de la técnica describe varias formas de producir tales anticuerpos humanizados; véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

El término "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que contribuye a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a un primer compañero de inmunoglobulina, para proporcionar la región codificante de inmunoglobulina alterada y el anticuerpo alterado expresado resultante con la especificidad antigénica y la actividad neutralizante característica del anticuerpo donante.

El término "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donante, que aporta todas (o cualquier parte, pero en algunos procedimientos todas) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones marco de cadena pesada y/o ligera y sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina. En ciertos procedimientos, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

Las "CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4a Ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Institutos Nacionales de Salud (1987). Hay tres CDR de cadena pesada y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, las "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, o las tres CDR de cadena ligera (o todas las CDR de cadena pesada y ligera, si es apropiado). La estructura y el plegamiento de proteínas del anticuerpo puede significar que otros residuos se consideran parte de la región de unión al antígeno y una persona experta lo entendería. Véase, por ejemplo, Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, páginas 877-883.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas y, en muchos casos, pueden agregarse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de la función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único de anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpos completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpos, o dominios variables de anticuerpos que se han truncado o comprenden extensiones del terminal N o C, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

La frase "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo ( $V_H$ ,  $V_{HH}$ ,  $V_L$ ) que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de una región o dominio V diferente. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, Homo o heteromultímero) con otras regiones variables diferentes o dominios variables en los que las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión al antígeno por el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, en el que el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" que es capaz de unirse a un antígeno como se usa el término en este documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo único de otras especies tales como dAb de  $V_{HH}$  de roedor (por ejemplo, como se divulga en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y Camélido (nanocuerpos). Los  $V_{HH}$  de Camélido son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Dichos dominios  $V_{HH}$  pueden

humanizarse de acuerdo con las técnicas estándar disponibles en la técnica, y dichos dominios todavía se consideran "anticuerpos de dominio" de acuerdo con la invención. Como se usa en este documento, "V<sub>H</sub> incluye dominios V<sub>HH</sub> de camélidos. Los NARV son otro tipo de dominio variable único de inmunoglobulina que se identificaron en peces cartilagosos, incluido el tiburón nodriza. Estos dominios también se conocen como región variable del receptor de antígeno nuevo (abreviado comúnmente como V(NAR) o NARV). Para más detalles véase, Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) y el documento US20050043519A.

El término "dominio de unión a epítipo" se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de una región o dominio V diferente, este puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo un dominio variable único de inmunoglobulina humana, de camélido o de tiburón.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de unión al antígeno" se refiere a un sitio en una proteína que es capaz de unirse específicamente al antígeno, este puede ser un dominio único, por ejemplo un dominio de unión al epítipo, o pueden ser dominios V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> emparejados como se pueden encontrar en un anticuerpo estándar. En algunos aspectos de la invención, los dominios F<sub>v</sub> de cadena sencilla (ScFv) pueden proporcionar sitios de unión al antígeno.

Los términos "mAbdAb" y "dAbmAb" se usan en el presente documento para referirse a proteínas de unión al antígeno de la presente invención. Los dos términos se pueden usar indistintamente, y se pretende que tengan el mismo significado que se usa en el presente documento.

Se describe un procedimiento para purificar una proteína que comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominio variable único de inmunoglobulina, a partir de una solución que contiene al menos un contaminante por cromatografía de superantígeno que comprende: a) adsorber la proteína al superantígeno inmovilizado en un soporte sólido ; b) eliminar al menos un contaminante poniendo en contacto el superantígeno inmovilizado que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende un carboxilato alifático; y c) eluir la proteína del superantígeno inmovilizado en el soporte sólido.

La cromatografía de afinidad se realiza usando un superantígeno. "Superantígeno" se refiere a ligandos genéricos que interactúan con miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas en un sitio que es distinto de los sitios de unión a ligando objetivo de estas proteínas. Las enterotoxinas estafilocócicas son ejemplos de superantígenos que interactúan con los receptores de células T. Los superantígenos que se unen a los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, la Proteína G, que se une a la región constante de IgG (Bjorck y Kronvall, J. Immunol., 133: 969 (1984)); Proteína A que se une a la región constante de IgG y los dominios V<sub>H</sub> (Forsgren y Sjoquist, J. Immunol., 97: 822 (1966)); y la Proteína L que se une a los dominios V<sub>L</sub> (Bjorck, J. Immunol., 140: 1194 (1988)). El superantígeno se selecciona del grupo que consiste en la Proteína A, la Proteína G y la Proteína L.

Cuando se usa en el presente documento, el término "Proteína A" abarca la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida en forma sintética (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y variantes de la misma que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3. La Proteína A se puede adquirir comercialmente a través de Repligen, Pharmacia and Fermatech.

Como se usa en el presente documento, la "cromatografía de afinidad" es un procedimiento cromatográfico que utiliza las interacciones reversibles específicas entre biomoléculas en lugar de las propiedades generales de la biomolécula, como el punto isoelectrico, la hidrofobicidad o el tamaño, para efectuar la separación cromatográfica. "Cromatografía de afinidad de Proteína A" o "Cromatografía de Proteína A" se refiere a un procedimiento cromatográfico de afinidad específico que hace uso de la afinidad de los dominios de unión a IgG de la Proteína A por la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina. Esta porción Fc comprende dominios constantes de inmunoglobulina humana o animal C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 o dominios de inmunoglobulina sustancialmente similares a estos. La Proteína A abarca la proteína nativa de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, la Proteína A producida por procedimientos recombinantes o sintéticos, y variantes que retienen la capacidad de unirse a una región Fc. En la práctica, la cromatografía de Proteína A implica el uso de Proteína A inmovilizada en un soporte sólido. Véase Gagnon, Protein A Affinity Chromotography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, páginas 155-198, Validated Biosystems, 1996. La Proteína G y la Proteína L también pueden usarse para la cromatografía de afinidad. El soporte sólido es una matriz no acuosa sobre la cual se adhiere la Proteína A (por ejemplo, una columna, resina, matriz, perla, gel, etc.). Dichos soportes incluyen agarosa, sefarosa, vidrio, sílice, poliestireno, carbón de colodión, arena, polimetacrilato, poli(estireno-divinilbenceno) entrecruzado y agarosa con extensor de superficie de dextrano y cualquier otro material adecuado. Tales materiales son bien conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para fijar el superantígeno al soporte sólido. Los procedimientos para fijar proteínas a soportes sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ostrove, en Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990. Dichos soportes sólidos, con y sin Proteína A o Proteína L inmovilizada, están fácilmente disponibles a través de muchas fuentes comerciales, tales como Vector Laboratory (Burlingame, California), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California), BioRad (Hercules, California), Amersham Biosciences (parte de GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y Millipore (Billerica, Mass).

El carboxilato alifático puede ser de cadena lineal o ramificada. El carboxilato alifático es un ácido carboxílico alifático o una sal del mismo, o la fuente del carboxilato alifático es un ácido carboxílico alifático o una sal del mismo. El carboxilato alifático puede ser de cadena lineal y seleccionado del grupo que consiste en ácido hexanoico (caproico), ácido heptanoico (enántico), ácido octanoico (caprílico), ácido decanoico (cáprico), o cualquier sal del mismo. El carboxilato alifático comprende una cadena principal de 6-12 carbonos. El carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caproato, heptanoato, caprilato y decanoato. La fuente del carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en un ácido carboxílico alifático, una sal de sodio de un ácido carboxílico alifático y una sal de potasio de un ácido carboxílico alifático. El tampón de lavado puede comprender caprilato de sodio o decanoato de sodio. El tampón de lavado puede comprender caprilato de sodio 15 mM a 125 mM, o decanoato de sodio 1 mM a 30 mM. El tampón de lavado puede comprender aproximadamente caprilato de sodio aproximadamente 100 mM, o decanoato de sodio aproximadamente 20 mM. En un procedimiento, el tampón de lavado comprende acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. El tampón de lavado puede comprender acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

En un procedimiento, al menos un contaminante es una proteína de la célula huésped o ADN de la célula huésped. En ciertos procedimientos, la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en, se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K562, células BHK, células PER.C6 y células HEK. La célula huésped puede ser una célula bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *E. Coli* (por ejemplo, W3110, BL21), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; las células eucariotas, tales como células fúngicas o de levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*).

Un "tampón" es una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base.

Un "tampón de equilibrio" en el presente documento es el que se usa para preparar la fase sólida para cromatografía.

El "tampón de carga" es el que se usa para cargar la mezcla de proteína y contaminantes en la matriz de cromatografía. Los tampones de equilibrio y carga pueden ser los mismos.

El "tampón de elución" se usa para eluir proteínas de la matriz de cromatografía.

Una "sal" es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base.

En un procedimiento, el tampón de lavado comprende un ácido orgánico, un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico y una base orgánica. En un procedimiento, el tampón de lavado se prepara sin la adición de NaCl.

En un procedimiento, el ácido orgánico incluye, pero no se limita a, ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, glicina, ácido fosfórico, glicilglicina, ácido succínico, TES(ácido 2-[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N, N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)) y MES (ácido- 2-(N-morfolino)etanosulfónico).

En un procedimiento, la base orgánica incluye, pero no se limita a, el grupo que consiste en base tris, arginina, Bis-tris, Bis-tris-Propano, Bicina(N,N-bis(2-hidroxi)etil)glicina), HEPES (ácido 4-2-hidroxi)etil-1-piperazinaetanosulfónico), TAPS (ácido 3- [[tris(hidroximetil)metil] amino]propanosulfónico) y Tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina).

En un procedimiento, la base conjugada del ácido orgánico es la sal de sodio, potasio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico. En un procedimiento, el ácido orgánico es ácido acético y la base conjugada del ácido acético es la sal de sodio.

En un procedimiento, la proteína es una proteína de unión a antígeno. En un procedimiento, la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo. En un procedimiento, el anticuerpo es de la clase IgG. En un procedimiento, la proteína de unión a antígeno es un dominio variable único de inmunoglobulina.

Se describe un procedimiento para purificar una proteína de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía de Proteína A que comprende:

- (a) equilibrar una Proteína A inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína A;
- (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la Proteína A inmovilizada en la fase sólida;
- (c) eliminar al menos un contaminante lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína A que comprende una base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a aproximadamente pH 7,5, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio aproximadamente 100 mM y decanoato de sodio aproximadamente 20 mM; y

(d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína A. En un procedimiento, todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl. En un procedimiento, el tampón de lavado de Proteína A comprende además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. En un procedimiento, el tampón de lavado de Proteína A comprende acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

En un procedimiento, el tampón de equilibrio comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, de ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, a aproximadamente pH 7,2; y el tampón de elución comprende acetato de sodio 1,8 mM y ácido acético aproximadamente 28,2 mM a aproximadamente 300 mM, a aproximadamente pH 2,4 a aproximadamente pH 3,6.

El procedimiento puede comprender además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes lavando la fase sólida con un segundo tampón de lavado de Proteína A que comprende una base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,2. En un procedimiento, el segundo tampón de lavado de Proteína A se prepara sin la adición de NaCl.

El procedimiento puede comprender además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) valorar la solución que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con tris 1 M.

El procedimiento puede comprender además filtrar la solución producida por la etapa (g).

Se describe un procedimiento para purificar una proteína de una solución contaminada de la misma por cromatografía de Proteína L que comprende:

- (a) equilibrar una Proteína L inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína L;
- (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la Proteína L inmovilizada en la fase sólida;
- (c) eliminar al menos un contaminante lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína L que comprende una base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a aproximadamente pH 7,5, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio aproximadamente 100 mM, decanoato de sodio aproximadamente 20 mM de y dodecanoato de sodio aproximadamente 20 mM d; y
- (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína L. En un procedimiento, todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl. En un procedimiento, el tampón de lavado de Proteína L comprende además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. En un procedimiento, el tampón de lavado de Proteína L comprende acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

En un procedimiento, el tampón de equilibrio comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, a aproximadamente pH 7,2; y el tampón de elución comprende acetato de sodio 1,8 mM y ácido acético aproximadamente 28,2 mM a aproximadamente 300 mM, a aproximadamente pH 2,4 a aproximadamente pH 3,6.

El procedimiento puede comprender además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes lavando la fase sólida con un segundo tampón de lavado de Proteína L que comprende una base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,2. En un procedimiento, el segundo tampón de lavado de Proteína L se prepara sin la adición de NaCl.

El procedimiento puede comprender además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) valorar la solución que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con tris 1 M.

El procedimiento puede comprender además el filtrado de la solución producida por la etapa (g).

La "solución" puede ser un medio de cultivo celular, por ejemplo, una corriente de alimentación de cultivo celular. La corriente de alimentación puede ser filtrada. La solución puede ser un caldo sin procesar clarificado (CUB) (o caldo de fermentación clarificado/sobrenadante). El CUB también se conoce como un sobrenadante de cultivo celular con cualquier célula y/o restos celulares eliminados por clarificación. Alternativamente, al menos un extracto periplasmático se recoge usando procedimientos conocidos en la técnica.

La solución puede ser una preparación lisada de células que expresan la proteína (por ejemplo, la solución es un lisado).

"Contaminante" se refiere a cualquier molécula extraña o indeseable que esté presente en la muestra de carga antes de la cromatografía de superantígeno o después de la cromatografía de superantígeno en el eluato. Puede haber "impurezas de proceso" presentes. Estas son impurezas que están presentes como resultado del proceso en el que se produce la proteína de interés. Por ejemplo, estas incluyen proteínas de la célula huésped (HCP), ARN y ADN (por

ejemplo, virus). "HCP" se refiere a proteínas, no relacionadas con la proteína de interés, producidas por la célula huésped durante el cultivo celular o la fermentación, incluidas las proteínas intracelulares y/o secretadas. Un ejemplo de una proteína de la célula huésped es una proteasa, que puede causar daño a la proteína de interés si todavía está presente durante y después de la purificación. Por ejemplo, si una proteasa permanece en la muestra que comprende la proteína de interés, puede crear sustancias o impurezas relacionadas con el producto que originalmente no estaban presentes. La presencia de proteasas puede causar la descomposición de la proteína de interés con el tiempo durante el proceso de purificación y/o en la formulación final. La eliminación de HCP, o niveles reducidos de HCP, por definición es igual a la eliminación o reducción de proteasas.

Las impurezas del proceso también incluyen componentes utilizados para hacer crecer las células o para asegurar la expresión de la proteína de interés, por ejemplo, disolventes (por ejemplo, metanol utilizado para cultivar células de levadura), antibióticos, metotrexato (MTX), componentes de medios, floculantes, etc. También se incluyen moléculas que forman parte de la fase sólida de superantígeno que se filtra en la muestra durante las etapas anteriores, por ejemplo, la Proteína A, la Proteína G o la Proteína L. Los contaminantes también incluyen "sustancias relacionadas con el producto" que incluyen proteínas que retienen su actividad pero son diferentes en su estructura; e "impurezas relacionadas con el producto" que incluyen proteínas que han perdido su actividad debido a su diferencia en la estructura. Estas variantes relacionadas con el producto incluyen, por ejemplo, especies de alto peso molecular (HMW), especies de bajo peso molecular (LMW), proteínas agregadas, precursores, proteínas degradadas, proteínas mal plegadas, proteínas unidas bajo disulfuro, fragmentos y especies desamidadas.

La presencia de cualquiera de estas impurezas en el eluato se puede medir para establecer si la etapa de lavado ha sido exitosa. Por ejemplo, se ha mostrado una reducción en el nivel de HCP detectado medida por los ng de HCP por mg de proteína (véase los Ejemplos).

En consecuencia, el eluato del soporte sólido superantígeno puede contener la proteína en una muestra con HCP o ADN presente en aproximadamente 5.000 partes por millón (ppm) o menos, 4.000 partes por millón (ppm) o menos, 3.000 partes por millón (ppm) o menos, 2.500 partes por millón (ppm) o menos, 2.000 partes por millón (ppm) o menos, 1.500 partes por millón (ppm) o menos, 1.000 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 900 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 800 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 700 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 600 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 500 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 400 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 300 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 200 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 100 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 90 ppm o menos, aproximadamente 80 ppm o menos, aproximadamente 70 ppm o menos, aproximadamente 60 ppm o menos, o aproximadamente 50 ppm o menos. "Ppm" es equivalente a ng/mg y "ppb" ("partes por billón") es equivalente a pg/mg.

Se puede mostrar una reducción en comparación con una etapa de lavado de control sin un carboxilato alifático. Alternativamente, la reducción puede mostrarse en comparación con una etapa de lavado de control sin un carboxilato alifático y acetato de sodio.

Un procedimiento como se describe, en el que la recuperación de la proteína de interés del eluato es 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % o menos, que incluye cualquier valor discreto dentro del intervalo de 100 % a 50 % o cualquier subintervalo definido por cualquier par de valores discretos dentro de este intervalo, después de la etapa de lavado de la invención. El porcentaje ( %) de recuperación en el eluato se calcula determinando la cantidad de proteína de interés en el eluato como un porcentaje de la cantidad de proteína de interés aplicada a la columna de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \text{Cantidad de producto en el eluato} \times 100$$

#### Cantidad de producto en la carga

La cantidad de contaminante presente en el eluato puede determinarse mediante ELISA, OCTET u otros procedimientos para determinar el nivel o uno o más de los contaminantes descritos anteriormente. En los ejemplos descritos en este documento, se usa un procedimiento ELISA para determinar el nivel de HCP en una muestra.

#### **Ejemplo 1 - Materiales y procedimientos.**

Todos los procesos cromatográficos se llevaron a cabo utilizando un sistema AKTA Explorer 100 de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La concentración de muestras de proteína pura se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm usando un NanoDrop 1000 (RN) de Thermo Scientific. Las concentraciones de proteína de muestras crudas se determinaron usando una columna de Proteína A POROS (2,1 x 30 mm) obtenida a través de Applied Biosystems (Foster City, CA) en un HPLC Agilent 1100 de Hewlett Packard (Palo Alto, CA). El medio de Protein A MabSelect SuRe se obtuvo a través de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Las columnas Vantage se obtuvieron a través de Millipore Corporation (Bedford, MA). Las mediciones de turbidez se tomaron usando un Tubidímetro 2100P con celdas de muestra de vidrio, catálogo # 24347-06 obtenido a través de HACH Company (Loveland, CO, EE. UU.). Todos los

productos químicos se obtuvieron a través de JT Baker (Phillipsburg, NJ) o Sigma Aldrich (St Louis, MO) y eran de grado USP.

5 Todos los experimentos de cromatografía se llevaron a cabo con una columna MabSelect SuRe de 1,1 x 25 cm en un sistema de cromatografía AKTA Explorer 100 a menos que se indique lo contrario. La concentración de anticuerpos del filtrado del cultivo celular se determinó mediante la proteína analítica A o se llevó a cabo mediante el ensayo de concentración de proteínas Biacore por el grupo de Ciencias Bioanalíticas en GSK, Upper Merion.

10 **Ejemplo 2 - Cribado inicial de aditivos de tampón de lavado**

10 Se prepararon tampones mediante valoración a pH específicos usando ácido acético o base tris. Como control, las condiciones de cribado se compararon con los resultados de un tampón de lavado similar a un tampón de lavado estándar de Proteína A con alto contenido de sal, tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2. Véase la Figura 1 para obtener una lista completa de las cinco condiciones experimentales probadas y las Tablas 3 y 4 para los resultados correspondientes. Los tampones de lavado se probaron en cromatografía de Proteína A del filtrado de cultivo celular de los activos de GSK anti-OSM (GSK315234) y anti-IL13 (GSK679586). Estos dos casos separados dieron como resultado tendencias de reducción de ADN y HCP similares. Los niveles de impureza en los productos de Proteína A para los tampones de lavado Triton X100 y Triton X114 no se evaluaron adicionalmente debido a un perfil de elución alterado y atípico y una pérdida excesiva de producto. El tampón que contiene PS80, un tensioactivo a base de polímero de óxido de etileno no iónico, mostró una eliminación marginal en comparación con el tampón de lavado estándar de NaCl 1 M. La mayor reducción en HCP y ADN provino del tampón de lavado que contenía caprilato de sodio 100 mM, una sal de sodio del ácido carboxílico, ácido octanoico. El tampón de caprilato 100 mM resultó en una reducción de aproximadamente 5 veces en HCP en comparación con el control para anti-OSM y anti-IL13. Además, resultó en una reducción de 100 veces y 60 veces en el ADN en comparación con el control para anti-IL13 y anti-OSM respectivamente. Véase la Tabla 3 y la Tabla para obtener datos completos de rendimiento, HCP, ADN y SEC para anti-OSM y anti-IL13 con condiciones de cribado de lavado.

Tabla 2. Resumen experimental de las condiciones de lavado

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equilibrar - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2
35 mg/mL	300	Cargar a 300 cm/hr
5 CV	400	Lavado 1 - Procedimiento # 1 - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2 2 - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1 %, pH 7,2 3 - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, Triton X100 al 1 %, pH 7,2 4 - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, Triton X114 al 1 %, pH 7,2 5 - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2
5 CV	400	Lavado 2 - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4 CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3 CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3 CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4 CV*	300	Almacenamiento - Etanol al 20 %, fosfato 50 mM, pH 7,0

\* Solo se ejecuta en el último ciclo para almacenar la columna

30 Tabla 3 Resultados experimentales del desarrollo de lavado anti-IL13

Tampón de lavado	Muestra	HCP	ADN	Monómero %	Rendimiento %	Veces que se reduce con respecto al control	
		ng/mg	pg/mg	SEC	Biacore	HCP	ADN
	Carga	458282	3219895	----	----		
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2 (control)</b>	Lavado con sal - Grupo con MabSelect SuRe	648	537	96,8 %	81,1 %	1	1
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100 mM pH 7,2</b>	Lavado con caprilato - Grupo con MabSelect SuRe	140	5	97,0 %	79,2 %	4,6	107

(continuación)

Tampón de lavado	Muestra	HCP	ADN	Monómero %	Rendimiento %	Veces que se reduce con respecto al control	
------------------	---------	-----	-----	------------	---------------	---	--

		ng/mg	pg/mg	SEC	Biacore	HCP	ADN
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1 %, pH 7,2</b>	Lavado con PS80 - Grupo con MabSelect SuRe	607	253	96,9 %	77,2	1,1	2,1

Tabla 4 Resultados experimentales del desarrollo de lavado anti-OSM

Tampón de lavado	Muestra	HCP	ADN	Monómero %	Rendimiento %
		ng/mg	pg/mg	SEC	Biacore
	Carga	242258	13550	----	----
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2 (control)</b>	Lavado con sal - Grupo con MabSelect SuRe	136	59	93,3 %	95,1 %
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100 mM pH 7,2</b>	Lavado con caprilato - Grupo con MabSelect SuRe	23	1	98,9 %	95,3 %
<b>Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1 %, pH 7,2</b>	Lavado con PS80 - Grupo con MabSelect SuRe	135	49	98,8 %	99,3 %

**Ejemplo 3 - Efecto de la concentración de caprilato sobre la eliminación de impurezas**

5 Para examinar los efectos de la concentración de caprilato de sodio sobre la eliminación de impurezas, se ensayaron una serie de concentraciones de caprilato de sodio. Véase la Tabla 5 para obtener una lista de tampones y caudales utilizados para examinar los efectos de la concentración de caprilato sobre la eliminación de impurezas para anti-OSM y anti-IL13. Los datos de los estudios de concentración de caprilato se resumen en la Figura 1 y la Figura 2 para anti-OSM y anti-IL13. Tanto para la cromatografía de anti-IL13 como de anti-OSM, los cambios en la concentración de caprilato claramente impactan la reducción de HCP y ADN de CHO. Se observó que cuanto mayor es la concentración de caprilato, mayor es la reducción de HCP y ADN tanto para anti-OSM como para anti-IL13. Sin embargo, se observó la mayor reducción en HCP y ADN con una combinación de caprilato de sodio y acetato de sodio 0,3 M. El efecto combinado del detergente y una sal aumentó la capacidad de eliminación del tampón en comparación con un detergente o una sal sola.

15 La concentración máxima de caprilato de sodio probada en este estudio fue caprilato de sodio 100 mM debido a una solubilidad determinada empíricamente de caprilato de sodio de aproximadamente 125 mM a un pH de 7,2. Dado que se espera que la solubilidad aumente a un pH más alto, se podrían probar concentraciones más altas de caprilato ajustando el sistema de tampón y los componentes, si fuera necesaria una mayor eliminación de contaminantes de la célula huésped. Sin embargo, con base en este trabajo, se determinó que el caprilato de sodio 100 mM en combinación con acetato de sodio 0,3 M produjo una eliminación adecuada de las impurezas de la célula huésped.

Tabla 5. Efecto de la concentración de caprilato en el diseño experimental

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equilibrar - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
35 mg/mL	300	Cargar a 300 cm/hr
5 CV	400	Lavado 1 - Procedimiento # 1 - tris 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 25 mM, pH 7,2 2 - tris 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 50 mM, pH 7,2 3 - tris 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 75 mM, pH 7,2 4 - tris 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2 5 - tris 50 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2
5 CV	400	Lavado 2 - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4 CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3 CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3 CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4 CV*	300	Almacenamiento - Etanol al 20 %, fosfato 50 mM, pH 7,0

\* Solo se ejecuta en el último ciclo para almacenar la columna

**Ejemplo 4 - Cribado de ácido carboxílico**

El caprilato de sodio es la sal de sodio del ácido caprílico, que consiste en una cadena alifática de ocho carbonos de largo perteneciente a una clase de ácidos carboxílicos. Estas sales saturadas anfipáticas no ramificadas actúan como un detergente debido a sus colas de carbono saturadas y al grupo de cabeza carboxilo cargado. Para determinar el efecto de la longitud de la cola de carbono en la eliminación de contaminantes, se probaron otras sales de sodio. Estas otras sales analizadas incluyen caproato de sodio, heptanoato de sodio, caprilato de sodio, decanoato de sodio y

dodecanoato de sodio. El diseño experimental se resume en la Tabla 6. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 3. El dodecanoato de sodio se excluyó del análisis debido al bajo rendimiento y al comportamiento de elución alterado observado en experimentos preliminares. Aunque todas las sales diferentes dieron como resultado rendimientos de productos similares, con la excepción del dodecanoato, cada uno dio como resultado perfiles de impurezas muy diferentes. A medida que el número de carbonos en la cadena aumentaba, los niveles de impurezas disminuían. Las sales de sodio con cadenas de carbono inferiores al caprilato de sodio (C8) dieron como resultado niveles de impurezas mucho más altos. Los dos mejores candidatos para un aditivo de tampón de lavado son el caprilato de sodio y el decanoato de sodio.

5

Tabla 6. Diseño experimental: comparación con ácido carboxílico

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equilibrar - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
35 mg/mL	300	Cargar a 300 cm/hr
5 CV	400	Lavado 1 - Procedimiento # 1 - tris 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, caproato de sodio 100 mM, pH 7,5 2 - tris 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, heptanoato de sodio 100 mM, pH 7,5 3 - tris 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,5 4 - tris 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, decanoato de sodio 20 mM, pH 8,0 5 - tris 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 M, dodecanoato de sodio 20 mM, pH 8,0
5 CV	400	Lavado 2 - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4 CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3 CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3 CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4 CV*	300	Almacenamiento - Etanol al 20 %, fosfato 50 mM, pH 7,0

\* Solo se ejecuta en el último ciclo para almacenar la columna

**Ejemplo 5 - Efecto del lavado optimizado sobre la turbidez**

15

Se exploraron también los efectos del lavado optimizado con caprilato en las operaciones unitarias posteriores; con un enfoque especial en su impacto para minimizar la precipitación posterior de Proteína A y mejorar la capacidad de filtración. El filtrado de cultivo celular anti-IL13 a partir del filtrado de cultivo celular anti-IL13 a razón de 1,16 g/l se procesó en una columna MabSelect SuRe de 2,6 x 27 cm usando dos regímenes de lavado diferentes. La mitad de este material se procesó mediante cromatografía de Proteína A utilizando el régimen de lavado optimizado que incorpora caprilato de sodio. La otra mitad del material se procesó con tampón de equilibrio en lugar del lavado con caprilato. Usando la turbidez como determinante de la capacidad de filtración, se registraron las mediciones de turbidez de los grupos de eluato. Los eluatos se valoraron luego a pH 3,5 con ácido acético 30 mM, ácido clorhídrico 100 mM. Las mediciones de turbidez se midieron y registraron nuevamente. Después de una hora de incubación de las muestras de eluato a pH 3,5, se valoraron luego a pH 6,0 en preparación para la siguiente operación unitaria. Se midieron y registraron las mediciones de turbidez de los grupos con pH ajustado. Los datos resultantes se resumen en la Tabla y el perfil de impurezas se presenta en la Tabla. Considerando la turbidez como un indicador de capacidad de filtración, el lavado con caprilato reduciría parte de la carga sobre la filtración debido a una disminución del 50 % en la turbidez del material de carga de intercambio aniónico.

20

25

Tabla 7 Mediciones de turbidez anti-IL13

	Con caprilato	Sin caprilato
Turbidez	NTU	NTU
Grupo con MabSure	36	79
Grupo de bajo pH	10	10
Grupo ajustado a pH 6,0	64	134

30

Tabla 8 Efecto del lavado de capilato sobre la pureza de los perfiles de impureza anti-IL13 post-Proteína A

35

	Con caprilato		Sin caprilato	
	HCP	ADN	HCP	ADN
Muestra	ng/mg	pg/mg	ng/mg	pg/mg
Grupo con MabSure	12	7	244	222
Grupo de bajo pH	15	7	248	134
Grupo ajustado a pH 6,0	6	< 10	195	< 10

**Ejemplo 6: Purificación de anticuerpos de dominio usando tampón de proteína A-caprilato en tampón de Tris-acetato.**

5 Se purificó DOM0100, una molécula de dAb de 25 kDa ( $V_k$ - $V_H$  albudAb+TNFR1dAb) expresada en *E. coli* usando la Proteína A, MabSelect Xtra de GE Healthcare empaquetada en una columna de 0,5 x 20 cm. El caudal fue de 300 cm/h para todas las etapas. Después del equilibrio con base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, pH 7,5, el filtrado de cultivo celular se cargó en la columna a razón de 13,5 mg/ml de resina. El título de carga fue 1,88 mg/ml. La columna se lavó luego usando 5 volúmenes de columna de base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato de sodio 300 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,5. La proteína se eluyó luego y luego se limpió la columna, se higienizó y almacenó. El análisis del pico de elución proporcionó 1.440 ppm de HCP (proteínas de la célula huésped) por ELISA para un rendimiento del 74,9 %. El mismo experimento repetido dos veces en las mismas condiciones, pero con un lavado con alto contenido de sal en lugar del lavado con caprilato produjo 2.398 ppm y 2.456 ppm de HCP por ELISA para un rendimiento de 77,2 % y 76,0 % respectivamente. El efecto de la secuencia cromatográfica evaluada en una columna de 0,5 cm x 10 cm que coincide con el tiempo de residencia no tuvo efecto sobre la capacidad de unión dinámica de hasta 150 ciclos. La selectividad de la resina se investigó igualmente para MabSelect y MabSelect SuRe estable en base usando la misma secuencia cromatográfica y produjo una calidad de producto HCP comparable.

**Ejemplo 7 - Purificación de dAb DAT06 usando Proteína L, lavado con caprilato y tampón de tris-acetato**

20 Se purificó DAT06, una molécula dAb de 11,5 kDa ( $V_k$ ) expresada en *E. coli* usando Proteína L (Capto L de GE Healthcare) empaquetada en una columna de 0,5 cm x 20 cm. El caudal fue de 300 cm/h para todos las etapas. Después de equilibrar con base tris 52 mM, ácido acético 48 mM, pH 7, el filtrado de cultivo celular se cargó a razón de 13 mg/ml de resina. La columna se lavó luego usando 5 CV, base tris 52 mM, ácido acético 48 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7, antes de equilibrarse nuevamente, eluirse, limpiarse, desinfectarse y almacenarse. El análisis del pico de elución proporcionó 5.815 ppm de HCP por ELISA para una recuperación del 96,4 %. En comparación, la misma secuencia cromatográfica con tris 52 mM, ácido acético 48 mM, NaCl 2 M, pH 7,0 etapa de lavado con alto contenido de sal proporcionó 7.476 ppm de HCP por ELISA y una recuperación del 85,1 %. Una etapa de lavado con el tampón de equilibrio, tris 52 mM, ácido acético 48 mM, pH 7,0 proporcionó 12.523 ppm de HCP por ELISA y una recuperación del 94,1 %.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de una proteína, a partir de una solución que contiene al menos un contaminante de la célula huésped que comprende: a) adsorber la proteína a la Proteína A, Proteína G o Proteína L inmovilizada sobre un soporte sólido; b) eliminar al menos un contaminante de la célula huésped poniendo en contacto el soporte sólido que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende un carboxilato alifático, en el que dicho carboxilato alifático comprende una cadena principal de 6-12 carbonos; y c) eluir la proteína del soporte sólido, en el que la solución es una corriente de alimentación de cultivo celular, en el que al menos un contaminante de la célula huésped es una proteína de la célula huésped o ADN de la célula huésped, en el que la proteína se selecciona de uno de: anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, scFv unido a disulfuro o diacuerpo, en el que el carboxilato alifático se selecciona de uno de: caproato, heptanoato, caprilato y decanoato, en el que la fuente del carboxilato alifático se selecciona de un ácido carboxílico alifático, una sal de sodio de un ácido carboxílico alifático o una sal de potasio de un ácido carboxílico alifático, y en el que cuando el carboxilato alifático es caprilato de sodio, la concentración de caprilato de sodio está entre aproximadamente 50 y aproximadamente 125 mM, en el que aproximadamente significa  $\pm 10\%$ .
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución es una corriente de alimentación de cultivo celular clarificada.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el carboxilato alifático es caprilato de sodio.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de lavado comprende caprilato de sodio aproximadamente 50 mM a aproximadamente 125 mM, o decanoato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM, en el que aproximadamente significa  $\pm 10\%$ .
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el tampón de lavado comprende (i) caprilato de sodio aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mM, en el que aproximadamente significa  $\pm 10\%$ ; o (ii) caprilato de sodio aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM o aproximadamente 125 mM, en el que aproximadamente significa  $\pm 10\%$ .
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de lavado comprende además acetato de sodio 100 mM a 400 mM, tal como acetato de sodio 300 mM.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que (i) la célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K562, células BHK, células PER.C6 o células HEK; y/o (ii) la proteína es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un dominio variable único de inmunoglobulina.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de lavado comprende además un ácido orgánico, un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico y una base orgánica y en el que el tampón de lavado se prepara sin la adición de NaCl.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, glicina, glicilglicina, ácido succínico, TES (ácido 2-[[tris(hidroxiometil)metil]amino]etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)) y MES (ácido-2-(N-morfolino)etanosulfónico) y en el que la base orgánica se selecciona del grupo que consiste en base tris, Bis-tris, Bis-tris-Propano, Bicina(N,N-bis(2-hidroxi)etil)glicina), HEPES (ácido 4-2-hidroxi)etil-1-piperazinaetanosulfónico), TAPS (ácido 3-[[tris(hidroxi)metil]metil]amino]propanosulfónico) y Tricina (N-tris(hidroxi)metil)metilglicina).
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que la base conjugada del ácido orgánico es la sal de sodio, potasio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- equilibrar una Proteína A inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína A;
  - adsorber la proteína de la solución a la Proteína A inmovilizada en la fase sólida;
  - eliminar al menos una impureza del proceso lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína A que comprende una base tris 50 mM a 55 mM, ácido acético 45 mM a 55 mM, al menos un carboxilato alifático, a un pH de 7,2 a 8,0, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio 100 mM y decanoato de sodio 20 mM; y
  - recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína A, en el que todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl.

- 5 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes de la célula huésped lavando la fase sólida con un segundo tampón de lavado de Proteína A que comprende una base tris 50-55 mM, Ácido acético 45-50 mM, a pH 7,2, en el que el segundo tampón de lavado de Proteína A se prepara sin la adición de NaCl.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- 10 (a) equilibrar una Proteína L inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de Proteína L;  
(b) adsorber la proteína de la solución a la Proteína L inmovilizada en la fase sólida;  
(c) eliminar al menos una impureza del proceso lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de Proteína L que comprende una base tris 50 mM a 55 mM, ácido acético 45 mM a 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a pH 7,5, en el que el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio 100 mM y decanoato de sodio 20 mM; y
- 15 (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de Proteína L, en el que todos los tampones se preparan sin la adición de NaCl.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes de la célula huésped lavando la fase sólida con un segundo
- 20 tampón de lavado de Proteína L que comprende una base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a pH 7,2, en el que el segundo tampón de lavado de Proteína L se prepara sin la adición de NaCl.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) valorar la solución que contiene la proteína recuperada a pH 3,0 con ácido acético
- 25 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a pH 3,0 durante 30 a 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a pH 7,5 con tris 1 M y opcionalmente filtrar la solución producida por la etapa (g).

Figura 1. Resultados del Estudio de la Concentración de Caprilato - anti-OSM

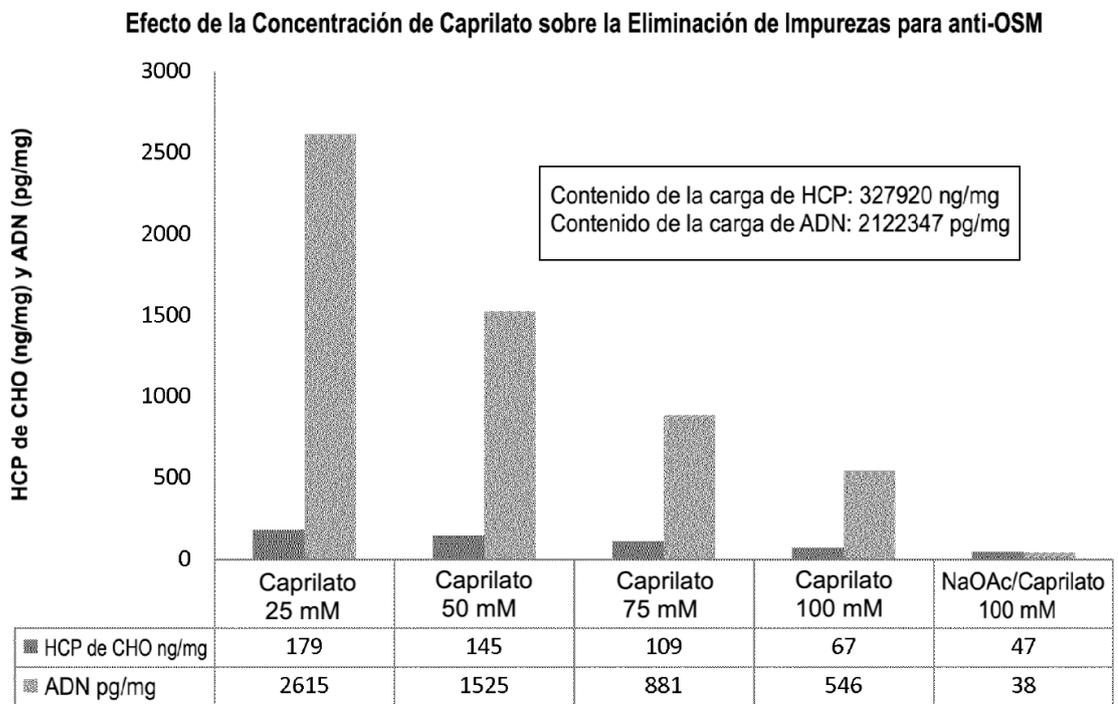


Figura 2. Resultados del Estudio de la Concentración de Caprilato - anti-IL13

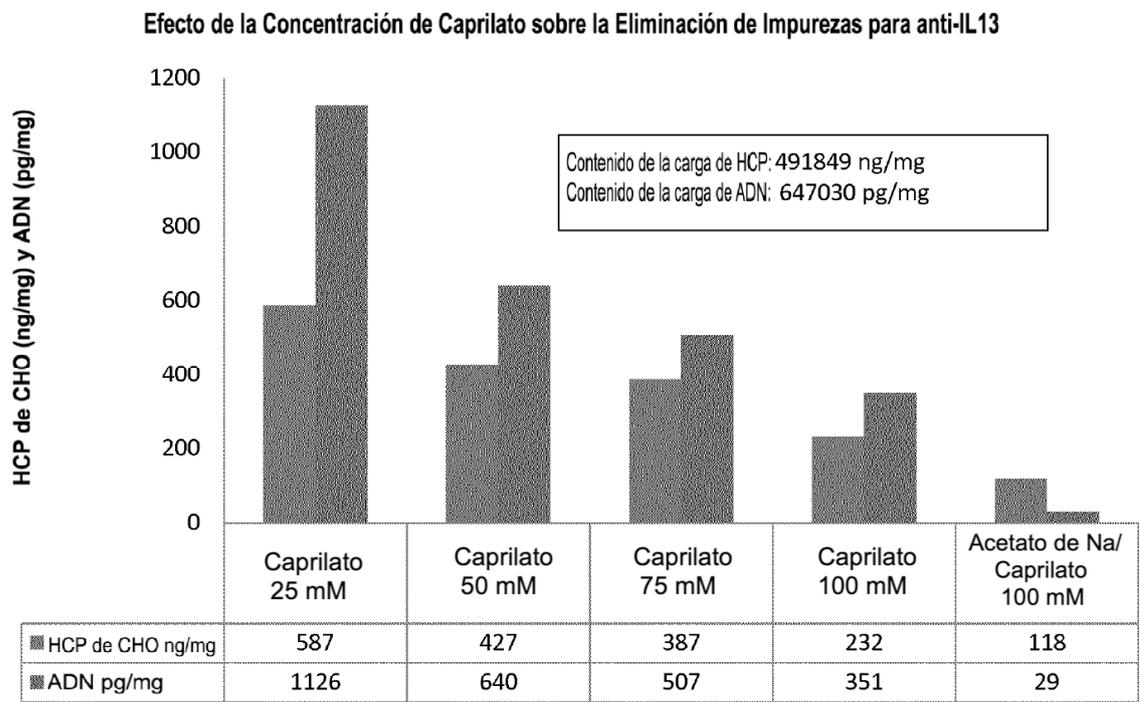


Figura 3. Resultados del Estudio de Comparación con Ácido Carboxílico

