

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 408**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2013 PCT/JP2013/057902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14024514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2013 E 13828251 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2883882**

54 Título: **Método de purificación de proteína**

30 Prioridad:

07.08.2012 US 201261680433 P

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

21.07.2020

73 Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku
Tokyo , JP**

72 Inventor/es:

ISHIHARA TAKASHI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 774 408 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de proteína.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para purificar una proteína y a un método para preparar una proteína que comprende el método de purificación. En particular, la presente invención se refiere a un método para purificar un anticuerpo, y a un método para preparar un anticuerpo que comprende el método de purificación.

10

Técnica anterior

El desarrollo de tecnologías de recombinación genética ha proporcionado fármacos que incluyen una variedad de proteínas como principio activo. En particular, se han desarrollado y comercializado recientemente numerosos fármacos que incluyen anticuerpos como principio activo. Además, la producción eficiente de estas proteínas a gran escala se ha convertido en un tema más importante en la industria biofarmacéutica.

15

Generalmente, tales proteínas se producen cultivando células recombinantes en las que se inserta un vector que incluye un gen que codifica una proteína de interés. El caldo de cultivo incluye impurezas tales como una amplia variedad de componentes derivados del medio, componentes derivados de células hospedadoras, subproductos derivados de proteínas, o similares, además de la proteína de interés. De este modo, es una tarea muy difícil y desafiante lograr tanto la purificación de la proteína de interés mediante la eliminación de impurezas para cumplir con los requisitos de pureza de los fármacos proteicos como la producción eficiente de la proteína de interés a gran escala.

20

25

En general, el método de purificación de proteínas se lleva a cabo mediante una combinación de diferentes modos de cromatografía. La cromatografía consiste en separar la proteína de interés de las impurezas, por ejemplo en función de la carga, la hidrofilia, el tamaño molecular, o similares.

30

En particular, cuando la proteína de interés es un anticuerpo, se usa la cromatografía de afinidad de proteína A o la cromatografía de afinidad de proteína G como una de las cromatografías para purificar el anticuerpo, usando la propiedad de unión de la proteína A o la proteína G a la región específica del anticuerpo, tal como la cadena Fc (documento 1 de patente).

35

Sin embargo, los soportes de afinidad de la proteína A generalmente usados son muy caros en comparación con los soportes de intercambio iónico o los soportes hidrófobos, y se necesita una gran cantidad de soportes para la purificación a gran escala de anticuerpos en producciones de fármacos industriales o similares, lo que da como resultado un aumento inevitable de los costes de producción.

40

Además, la cromatografía de afinidad de proteína A o la cromatografía de afinidad de proteína G generalmente se lleva a cabo en un modo de adsorción adsorbiendo específicamente el anticuerpo de interés sobre el soporte, lavando el soporte de adsorción para separar las impurezas, y eluyendo finalmente el anticuerpo de interés del soporte. A este respecto, los amortiguadores usados en las etapas de lavado y elución son diferentes entre sí, el aumento de escala del aparato de cromatografía resalta el agrandamiento o complejidad de las instalaciones de producción que lo acompañan, como el tanque de amortiguador, y además, las manipulaciones se vuelven complicadas.

45

Todos estos factores son la causa del aumento de los costes de producción.

50

Por estas razones, los fármacos que incluyen proteínas como principio activo requieren costes de producción mucho más altos que los fármacos que incluyen compuestos de moléculas pequeñas como principio activo, lo cual es un problema difícil. Es decir, se exige una reducción en el coste de purificación de proteínas en este campo.

55

Por otro lado, es conocido que las enzimas segregadas por las células hospedadoras se incluyen en un caldo de cultivo que contiene la proteína de interés, y la proteína de interés es degradada, modificada, oxidada, o reducida por estas enzimas durante el procedimiento de purificación de proteínas. Por esta razón, se ha considerado que la adición de inhibidores enzimáticos durante la purificación de proteínas previene la degradación, modificación, oxidación, o reducción de la proteína de interés (documento 2 de patente). Sin embargo, cuando los inhibidores enzimáticos se usan durante la purificación de proteínas, se requiere un procedimiento adicional para eliminar los inhibidores y, además, ciertos inhibidores pueden afectar la calidad de la proteína purificada. Por lo tanto, no se puede decir que la adición de inhibidores sea la mejor manera. La eliminación de las enzimas derivadas de la célula hospedadora se considera uno de los métodos drásticos para resolver los problemas, pero es esencial usar la cromatografía. No existe un método simple para eliminar estas enzimas.

60

65

El carbón activado es un material natural económico que presenta amplias propiedades de adsorción inespecíficas, y se usa como adsorbente o decolorante en los campos industriales, tales como la producción de productos

químicos y alimentos, el tratamiento de aguas negras o aguas residuales, la filtración de agua, y la producción de fármacos de molécula pequeña. Sin embargo, debido a las amplias propiedades de adsorción no específicas, se ha pensado que existen dificultades en el uso de carbón activado para la purificación de proteínas de alto rendimiento, tales como la separación de las impurezas mencionadas anteriormente. De este modo, todavía no se conoce un método para purificar una proteína usando el carbón activado.

Listado de referencias

Documentos de patente

- [Documento 1 de patente] Publicación de patente japonesa nº Hei5-504579
- [Documento de patente 2] Publicación de patente internacional nº 2009/009523

Divulgación de la invención

Problemas que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de purificación que puede reducir el coste de producción o reducir la mano de obra más que los métodos de purificación de proteínas convencionales, y presenta propiedades de separación de impurezas superiores o equivalentes a los métodos de purificación de proteínas convencionales, en particular, como una alternativa a cromatografía de afinidad de proteína A para la purificación de anticuerpos, y un método para preparar una proteína que comprende el método de purificación.

Medios para resolver los problemas

En el contexto de la presente invención se han realizado muchos esfuerzos para resolver los objetos anteriores. Como resultado, se descubrió sorprendentemente un método para purificar una proteína separando la proteína de las impurezas usando un carbón activado barato en un modo de no adsorción, en particular, un método para purificar un anticuerpo usando el carbón activado en lugar de la cromatografía de afinidad de proteína A, completando así la presente invención.

La presente invención proporciona:

- [1] Un método para purificar una proteína, en el que la proteína se separa de las impurezas usando un carbón activado para obtener la proteína con un bajo contenido de impurezas, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal, en el que el pH de la disolución acuosa que contiene una proteína a contactar con el carbón activado es 4 a 5, en el que las impurezas son cualquiera de las proteínas de la célula hospedadora, polímeros derivados de proteínas, productos de degradación derivados de proteínas, o ADN, y en el que no se usa la cromatografía de proteína A.
- [2] El método de purificación según [1], en el que la proteína presenta un peso molecular de 30000 o más.
- [3] El método de purificación según [1] o [2], en el que la proteína es una glucoproteína.
- [4] El método de purificación según uno cualquiera de [1] a [3], en el que la proteína es una proteína genéticamente modificada.
- [5] El método de purificación según uno cualquiera de [1] a [4], en el que el método se lleva a cabo en un modo de no adsorción.
- [6] El método de purificación según uno cualquiera de [1] a [5], en el que el carbón activado es un carbón activado de la madera.
- [7] El método de purificación según uno cualquiera de [1] a [6], en el que el carbón activado presenta un diámetro medio de microporos de 0.5 a 5 nm.
- [8] Un método para preparar una proteína, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal, que comprende el método de purificación de uno cualquiera de [1] a [7].
- [9] El método de preparación según [8], que comprende una cualquiera de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, y cromatografía multimodal.
- [10] El método de preparación según uno cualquiera de [8] a [9], que comprende por lo menos una cromatografía en modo de adsorción.

[11] El método de purificación según uno cualquiera de [1] a [7], en el que la disolución acuosa que contiene una proteína se obtiene mediante un tratamiento de pH bajo y la posterior eliminación de precipitados, en el que opcionalmente el pH del tratamiento de pH bajo es pH 3 a 6 y se ajusta mediante la adición de un ácido.

5

Se divulga además en la presente memoria:

- (1) Un método para purificar una proteína, en el que la proteína se separa de las impurezas usando un carbón activado para obtener la proteína con un bajo contenido de impurezas.
- (2) El método de purificación descrito en (1), en el que la proteína presenta un peso molecular de 30000 o más.
- (3) El método de purificación descrito en (1) o (2), en el que la proteína es una glucoproteína.
- (4) El método de purificación descrito en (3), en el que la glucoproteína es un anticuerpo.
- (5) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (4), en el que la proteína es una proteína genéticamente modificada.
- (6) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (5), en el que las impurezas son uno cualquiera de proteínas de la célula hospedadora, polímeros derivados de proteínas, productos de degradación derivados de proteínas, o ADN.
- (7) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (6), en el que el método se lleva a cabo en un modo de no adsorción.
- (8) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (7), en el que la separación se lleva a cabo a pH 3 a 8.
- (9) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (8), en el que el carbón activado es un carbón activado de la madera.
- (10) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (9), en el que el carbón activado presenta un diámetro medio de microporos de 0.5 a 5 nm.
- (11) Un método para preparar una proteína, que comprende el método de purificación de uno cualquiera de (1) a (10).
- (12) El método de preparación descrito en (11), en el que no se usa la cromatografía de proteína A.
- (13) El método de preparación descrito en (11) o (12), que comprende una cualquiera de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, y cromatografía multimodal.
- (14) El método de preparación descrito en uno cualquiera de (11) a (13), que comprende por lo menos una cromatografía en modo de adsorción.
- (15) Una proteína que se prepara por el método de uno cualquiera de (11) a (14).

Efecto de la invención

La presente invención proporciona un método de purificación que puede reducir el coste de producción o reducir la mano de obra más que los métodos de purificación de proteínas convencionales, y presenta propiedades de separación de impurezas superiores o equivalentes a los métodos de purificación de proteínas convencionales, en particular, como una alternativa a la cromatografía de afinidad de proteína A para purificación de anticuerpos, y un método para preparar una proteína que comprende el método de purificación. La proteína preparada por la presente invención es útil como fármaco.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los contenidos de polímero del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido de polímero (%), el color negro representa Mab A, y el color blanco representa Mab B, el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos de polímero del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto final purificado (producto purificado).

La figura 2 representa los contenidos del producto de degradación del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido del producto de degradación (%), el color negro representa Mab A, el color blanco representa Mab B, y el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos del producto de degradación del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto purificado final (producto purificado).

La figura 3 representa los contenidos de proteína de la célula hospedadora del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido de proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína (ng/mg), el color negro representa Mab A, el color blanco representa Mab B, y el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos de proteína de la célula hospedadora del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto purificado final (producto purificado).

La figura 4 representa los contenidos de polímero del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido de polímero (%), el color negro representa Mab A, el color blanco representa Mab B, y el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos de polímero del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto purificado final (producto purificado).

La figura 5 representa los contenidos del producto de degradación del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido del producto de degradación (%), el color negro representa Mab A, el color blanco representa Mab B, y el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos del producto de degradación del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto purificado final (producto purificado);

La figura 6 representa los contenidos de proteína de la célula hospedadora del sobrenadante y el producto purificado final en modo de no adsorción que comprende la purificación mediante carbón activado de Mab A, Mab B y Mab C. El eje vertical representa el contenido de proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína (ng/mg), el color negro representa Mab A, el color blanco representa Mab B, y el color gris representa Mab C. Desde la izquierda, se representan los contenidos de proteína de la célula hospedadora del sobrenadante de cultivo (sobrenadante de cultivo) y el producto purificado final (producto purificado).

La figura 7 representa la tasa de recuperación de cada procedimiento y la tasa de recuperación total en la purificación de Mab A. El eje vertical representa la tasa de recuperación de cada procedimiento (%) o la tasa de recuperación total (%), el color blanco representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, el color negro representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan la tasa de recuperación del tratamiento con MabSelect SuRe o el tratamiento con carbón activado (proteína A o carbón activado), la tasa de recuperación del tratamiento con Q Sepharose (Anión), la tasa de recuperación del tratamiento con POROS XS (catión), y la tasa de recuperación total (tasa de recuperación total).

La figura 8 representa la tasa de recuperación de cada procedimiento y la tasa de recuperación total en la purificación de Mab B. El eje vertical representa la tasa de recuperación de cada procedimiento (%) o la tasa de recuperación total (%), el color negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el color gris representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan la tasa de recuperación del tratamiento con MabSelect SuRe o el tratamiento con carbón activado (proteína A o carbón activado), la tasa de recuperación del tratamiento con Q Sepharose (anión), la tasa de recuperación del tratamiento con POROS XS (catión), y la tasa de recuperación total (tasa de recuperación total).

La figura 9 representa los contenidos de polímero del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab A. El eje vertical representa el contenido de polímero (%). El círculo negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el triángulo blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos de polímero de la disolución clarificada A (sobrenadante), el eluido de MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab A final (catión).

La figura 10 representa los contenidos del producto de degradación del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab A. El eje vertical representa el contenido del producto de degradación (%). El círculo negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el triángulo blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos del producto de degradación de la disolución clarificada A

(sobrenadante), el de eluido MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab A final (catión).

5 La figura 11 representa los contenidos de polímero del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab B. El eje vertical representa el contenido de polímero (%). El diamante negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el cuadrado blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos de polímero de la disolución clarificada B (sobrenadante), el eluido de MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab B final (catión).

10 La figura 12 representa los contenidos del producto de degradación del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab B. El eje vertical representa el contenido del producto de degradación (%). El diamante negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el cuadrado blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos del producto de degradación de la disolución clarificada B (sobrenadante), el eluido de MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o Carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab B final (catión).

15 La figura 13 representa los contenidos de proteína de la célula hospedadora del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab A. El eje vertical representa el contenido de la proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína (ng/mg). El círculo negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el triángulo blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos de proteína de la célula hospedadora de la disolución clarificada A (sobrenadante), el eluido de MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab A final (catión).

20 La figura 14 representa los contenidos de proteína de la célula hospedadora del intermedio de purificación y el producto purificado final en la purificación de Mab B. El eje vertical representa el contenido de la proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína (ng/mg). El diamante negro representa la purificación que comprende la cromatografía de afinidad de proteína A, y el cuadrado blanco representa la purificación que comprende el tratamiento con carbón activado. Desde la izquierda, se representan los contenidos de proteína de la célula hospedadora de la disolución clarificada A (sobrenadante), el eluido de MabSelect SuRe o el eluido de carbón activado (proteína A o carbón activado), el eluido de Q Sepharose (anión), y el producto purificado Mab B final (catión).

25 La figura 15 representa SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo de Mab B. Desde la izquierda, se representan (A) la disolución clarificada, (B) el sobrenadante que se mantuvo con la adición de carbón activado durante 24 horas y entonces se eliminó el carbón activado del mismo, y (C) el sobrenadante que se mantuvo durante 24 horas sin adición de carbón activado.

30 La figura 16 representa SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo de Mab D. Desde la izquierda, se representan (A) el sobrenadante, (B) el sobrenadante que se trató con adición/eliminación de carbón activado y se mantuvo durante 24 horas, y (C) el sobrenadante que solo se trató con eliminación y se mantuvo durante 24 horas.

35 La figura 17 representa los contenidos de ADN por 1 mg de proteína en el producto purificado final de purificación mediante carbón activado y el producto purificado de purificación mediante proteína A, con respecto a Mab A y Mab B. El eje vertical representa el contenido de ADN por 1 mg de proteína (pg/mg). Desde la izquierda, se representan los contenido de ADN por 1 mg de proteína en el producto purificado de Mab A de purificación mediante proteína A que se obtuvo mediante el Ejemplo 1 comparativo (proteína A de Mab A), el producto purificado de Mab A final de purificación mediante carbón activado que se obtuvo en el Ejemplo 7 (carbón activado Mab A), el producto purificado de Mab B de purificación mediante proteína A que se obtuvo mediante el Ejemplo 2 comparativo (proteína A de Mab B), y el producto purificado de Mab B final de purificación mediante carbón activado que se obtuvo mediante el ejemplo 8 (carbón activado Mab B).

40 La figura 18 representa la tasa de reducción de las proteínas de la célula hospedadora del eluido de carbón activado a cada pH mediante el tratamiento de Mab B con carbón activado. El eje vertical representa la tasa de reducción de la proteína de la célula hospedadora del eluido de carbón activado (HCP LRV). Desde la izquierda, se representan las tasas de reducción de la proteína de la célula hospedadora del eluido de carbón activado a pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, y pH 8.

45 La figura 19 representa la concentración relativa de anticuerpos del eluido de carbón activado a cada pH por tratamiento de Mab B con carbón activado. El eje vertical representa la concentración relativa de anticuerpos del eluido de carbón activado (%), cuando la concentración de anticuerpos del eluido de carbón activado a pH 7 se considera 100. Desde la izquierda, se representan las concentraciones relativas de anticuerpos del eluido de carbón activado a pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, y pH 8.

La figura 20 representa el contenido de polímero del eluido de carbón activado por tratamiento de Mab B con diferentes tipos de carbón activado. El eje vertical representa el contenido de polímero del eluido de carbón activado (%). Desde la izquierda, se representan los contenidos de polímero de los eluidos de carbón activado en el sobrenadante de cultivo, SHIRASAGI P, SHIRASAGI DO-2, y SHIRASAGI DO-5.

La figura 21 representa el contenido del producto de degradación del eluido de carbón activado por tratamiento de Mab B con diferentes tipos de carbón activado. El eje vertical representa el contenido del producto de degradación del eluido de carbón activado (%). Desde la izquierda, se representan los contenidos del producto de degradación de los eluidos de carbón activado en el sobrenadante de cultivo, SHIRASAGI P, SHIRASAGI DO-2, y SHIRASAGI DO-5.

La figura 22 representa el contenido de proteína de la célula hospedadora del eluido de carbón activado mediante el tratamiento de Mab B con diferentes tipos de carbón activado. El eje vertical representa el contenido de proteína de la célula hospedadora del eluido de carbón activado (ng/mg). Desde la izquierda, se representan los contenidos de proteína de la célula hospedadora de los eluidos de carbón activado en el sobrenadante de cultivo, SHIRASAGI P, SHIRASAGI DO-2 y SHIRASAGI DO-5.

Formas de realización para poner en práctica la invención

La presente invención se refiere a un método para purificar una proteína, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal, en el que la proteína se separa de las impurezas usando un carbón activado para obtener una proteína que presenta un contenido más bajo de impurezas.

En la presente invención, los ejemplos de la proteína pueden incluir proteínas naturales o no naturales que no presentan cadena de azúcar, glucoproteínas naturales o no naturales, derivados de las mismas, o similares. Las glucoproteínas o derivados de las mismas pueden ser composiciones que comprenden moléculas diferentes en sus cadenas de azúcar.

La proteína puede ser una proteína que presenta un peso molecular de preferentemente 30000 o mayor, y más preferentemente 50000 o mayor.

Los ejemplos de los anticuerpos pueden incluir anticuerpos de ratón, anticuerpos de llama, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos con regiones Fc modificadas, o similares. Los ejemplos del tipo molecular pueden incluir IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, Fab, Fc, proteínas de fusión de Fc, VH, VL, VHH, Fab₂, scFv, scFab, scDb, scDbFc, o similares.

En el método de purificación de la presente invención, se proporciona una disolución acuosa que contiene una proteína que incluye una proteína de interés e impurezas.

Los ejemplos de la disolución acuosa que contiene una proteína pueden incluir una composición obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, un caldo de cultivo de células productoras de proteínas, o bacterias tales como E. coli, que se obtienen mediante una técnica de recombinación genética o una técnica de fusión celular, una composición obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos, una composición obtenida por síntesis de proteínas libres de células, o similares.

Los ejemplos de la célula productora de proteínas pueden incluir una célula transformada en la que un gen que codifica una proteína de interés está integrado en una célula hospedadora, o similar.

Los ejemplos de la célula hospedadora pueden incluir estirpes celulares de células animales, células vegetales, células de levadura, o similares.

Los ejemplos específicos de las mismas pueden incluir células de ovario de hámster chino (células CHO), células de mieloma de ratón tales como células NS0 y células SP2/0, células de mieloma de rata tales como células YB2/0 y células IR983F, células BHK derivadas de riñón de hámster sirio, células de mieloma humano tales como células de Namalwa, células madre embrionarias, anficitulas, o similares.

Un medio para cultivar las células productoras de proteínas puede ser cualquier medio, siempre que sea adecuado para cultivar cada una de las células, y los ejemplos del medio para cultivar células animales pueden incluir medios típicos usados para cultivar células animales. Por ejemplo, se puede usar cualquier medio de un medio que contenga suero, un medio que no contenga ningún componente derivado de animales, tal como seroalbúmina o fracción de suero, un medio libre de suero o un medio libre de proteínas, y preferentemente, se puede usar el medio libre de suero o el medio libre de proteínas.

Específicamente, por ejemplo, se usa medio RPMI1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado de Dulbecco (DMEM)

[Virology, 8, 396 (1959)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], medio F12 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)], medio de Dulbecco modificado de Iscove (medio IMDM) [J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)], medio EX-CELL302, medio EX-CELL-CD-CHO, y medio EX-CELL 325 (que se fabrican por SAFC bioscience Inc.), medio CD-CHO y medio CD DG44 (que se fabrican por Invitrogen Corp.) o medio IS CD-CHO (fabricado por Irvine Scientific Sales Co., Inc.), medios modificados de los mismos, medios mixtos de los mismos, medios concentrados de los mismos, o similares, y preferentemente se usa medio RPMI1640, medio DMEM, medio F12, medio IMDM, medio EX-CELL302, medio CD-CHO, o medio IS CD-CHO.

Si es necesario, se pueden añadir sustancias fisiológicamente activas o factores nutrientes esenciales para el crecimiento de las células productoras de proteínas. Estos aditivos pueden incluirse previamente en el medio antes del cultivo, o bien suministrarse adecuadamente al líquido de cultivo como un medio aditivo o una disolución aditiva durante el cultivo. El método de suministro adicional puede llevarse a cabo usando cualquier forma de una disolución o mezclas de dos o más disoluciones por cualquiera de suministro continuo o intermitente.

Los animales no humanos, plantas o insectos transgénicos que producen proteínas pueden ser animales no humanos, plantas o insectos en los que el gen que codifica la proteína está integrado en sus células. Los ejemplos de animales no humanos pueden incluir ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, perro, oveja, cerdo, cabra, ganado, o mono. Los ejemplos de las plantas pueden incluir tabaco, patata, tomate, zanahoria, soja, brassica, alfalfa, arroz, trigo, cebada, maíz, o similares.

Los ejemplos del método para producir la disolución acuosa que contiene una proteína pueden incluir los descritos en la publicación de patente internacional nº 2008/120801, publicación japonesa nº Hei3-198792, publicación de patente internacional nº 2010/018847, publicación de patente internacional nº 2007/062245, publicación de patente internacional nº 2007/114496, o similar.

Además, en la presente invención, la disolución acuosa que contiene una proteína incluye una disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación, además de las obtenidas del cuerpo vivo, tales como plasma, orina, o similares. Los ejemplos específicos de las mismas pueden incluir un líquido libre de células, un líquido libre de precipitados, una fracción de alcohol, una fracción de precipitación con sal, un eluido de cromatografía, o similares.

El líquido libre de células puede ser un líquido que se prepara eliminando células de la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de células establecidas por la técnica de recombinación genética, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación, o similares. Los ejemplos específicos del mismos pueden incluir disoluciones que se obtienen eliminando células de un caldo de cultivo celular mediante centrifugación, filtración de flujo cruzado (filtración de flujo tangencial), filtración usando un filtro de profundidad, filtración usando un filtro de membrana, diálisis, combinaciones de los mismos, o similares.

Los ejemplos específicos del filtro de profundidad pueden incluir un filtro de profundidad Millistak + HC, un filtro de profundidad Millistak + DE, un filtro de profundidad Millistak + CE (fabricados por Merck millipore Corp.), un filtro de profundidad SUPRA P (fabricado por Pall Corp.), un filtro de profundidad Sartoclear PB, un filtro de profundidad Sartoclear PC (fabricados por Sartorius Corp.), un filtro de profundidad Zeta plus SP, un filtro de profundidad Zeta plus AP, un filtro de profundidad Zeta plus LA, un filtro de profundidad Zeta plus-Delipid, un filtro de profundidad Zeta plus ZA o un filtro de profundidad cargado Zeta plus EXT (fabricados por Sumitomo 3M Ltd., pero no están limitados a ellos).

El líquido libre de precipitados puede ser un líquido que se prepara mediante floculación o separación bifásica de la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de células establecidas por la técnica de recombinación genética, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida por síntesis de proteínas libre de células, o la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación mediante un tratamiento de pH bajo o mediante la adición de ácido caprílico, un disolvente orgánico, polietilenglicol, un tensioactivo, una sal, un aminoácido, un polímero, o similar, y entonces eliminando los precipitados de la misma. Los ejemplos del método para eliminar precipitados pueden incluir centrifugación, filtración de flujo cruzado (filtración de flujo tangencial), filtración usando un filtro de profundidad, filtración usando un filtro de membrana, diálisis, combinaciones de los mismos, o similares.

El pH del tratamiento de pH bajo es preferentemente pH 3 a 6, y se ajusta mediante la adición de un ácido tal como ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, o similares.

La fracción de alcohol puede ser una fracción que se prepara mediante la adición de alcohol o similar a la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos,

la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de células establecidas por la técnica de recombinación genética, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida por síntesis de proteínas libres de células, o la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir fracciones obtenidas por fracción de etanol a baja temperatura, o similares.

5 La fracción de precipitación con sal puede ser una fracción que se prepara añadiendo una sal tal como sulfato de amonio, sulfato de sodio, citrato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, o similares a la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de células establecidas por la técnica de recombinación genética, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida por síntesis de proteínas libres de células, o la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación, para precipitar proteínas.

15 El eluido de cromatografía puede ser un eluido de proteína que se prepara mediante la adsorción de la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del cuerpo vivo, tal como plasma, suero, leche materna, u orina, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de animales no humanos, plantas o insectos transgénicos, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida de células establecidas por la técnica de recombinación genética, la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida por síntesis de proteínas libres de células, o la disolución acuosa que contiene una proteína obtenida del procedimiento de purificación en un soporte o una membrana usada en la cromatografía para eluirla usando una disolución de elución adecuada, o sin adsorberla.

20 El soporte o la membrana usada en la cromatografía puede incluir un soporte de afinidad, un soporte de intercambio iónico, una membrana de intercambio iónico, un soporte de filtración en gel, un soporte de interacción hidrófoba, un soporte de fase inversa, un soporte de hidroxapatita, un soporte de fluorapatita, un soporte de sulfato de celulosa, un soporte de sulfato de agarosa, un soporte multimodal, o similar.

El soporte de intercambio iónico o la membrana de intercambio iónico puede ser un soporte o una membrana que se prepara inmovilizando directa o indirectamente una molécula que presenta un grupo de intercambio iónico, tal como un grupo sulfato, un grupo sulfato de metilo, un grupo sulfofenilo, un grupo sulfonpropilo, un grupo carboximetilo, un grupo amonio cuaternario, un grupo aminoetilo cuaternario, un grupo dietilaminoetilo, o similares, sobre un soporte base o una membrana, por ejemplo un polímero o un derivado del mismo (incluyendo polímero reticulado) tal como celulosa, sefariosa, agarosa, quitosano, un polímero de ácido acrílico, o un copolímero de estireno-divinilbenceno, un polímero que consiste en partículas de sílice, partículas de vidrio, partículas de cerámica, o partículas de los mismos tratadas en la superficie. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, ANX Sepharose FF, Capto Q, Capto DEAE, Capto Q ImpRes (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), TOYOPEARL GigaCap Q-650, TOYOPEARL SuperQ-650 (que se fabrican por TOSOH Corp.), Fractogel DEAE, Fractogel TMAE, Fractogel TMAE Hicap, Eshmuno Q (que se fabrican por Merck millipore Corp.), Cellufine MAX-Q (fabricado por JNC Corp.), Mustang Q (fabricado por Pall Corp.), Sartobind Q, Sartobind STIC (que se fabrican por Sartorius Corp.), SP Sepharose FF, CM Sepharose FF, SP Sepharose XL, Capto S (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), Poros 50 HS, Poros 50 XS (que se fabrican por Applied Biosystems Inc.), Eshmuno S, Fractogel COO⁻, Fractogel SO³⁻, Fractogel SE Hicap (que se fabrican por Merck millipore Corp.), TOYOPEARL GigaCap S-650, TOYOPEARL GigaCap CM-650 (que se fabrican por TOSOH Corp.), Cellufine MAX-S (fabricado por JNC Corp.), Mustang S (fabricado por Pall Corp.) o Sartobind S (fabricado por Sartorius Corp.), DIAION PK, DIAION PA, DIAION CR, DIAION CR, DIAION AMP (que se fabrican por Mitsubishi Chemical Corp.), o similares, pero son se limitan a los mismos.

El soporte de afinidad puede ser un soporte que se prepara inmovilizando directa o indirectamente una molécula que presenta una afinidad por la proteína de interés, por ejemplo heparina, proteína A, proteína G, proteína L, o similar, sobre el soporte base anterior, y ejemplos específicos del mismo pueden incluir Heparin Sepharose 6 Fast Flow (fabricado por GE Healthcare Ltd., Inc.), Procep-heparin (fabricado por Merck millipore Corp.), TOYOPEARL AF-Heparin-650 (fabricado por TOSOH Corp.), Heparin HyperD (fabricado por Pall Corp.), MabSelect, Protein A Sepharose FF, MabSelect Xtra, MabSelect SuRe, MabSelect SuRe LX, Protein G Sepharose FF, Capto L (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), Prosep vA Hicapacity, Prosep vA Ultra, Prosep Ultraplus (que se fabrican por Merck millipore Corp.), o similares.

Los ejemplos del soporte de filtración en gel pueden incluir un soporte compuesto de un polímero que consiste en dextrano, alil dextrano, N,N'-metilenbisacrilamida, celulosa, agarosa, estireno, divinilbenceno, alcohol polivinílico, sílice, quitosano, o similares, y ejemplos específicos del mismo pueden incluir la serie Sephacryl S, la serie Sepharose, la serie Sephadex, la serie Superdex, la serie Sephacryl (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), la serie TOYOPEARL HW, la serie TSKgel PW (que se fabrican por TOSOH Corp.), Bio gel Agarose, Bio gel P Polyacrylamide (que se fabrican por Bio-Rad Inc.), Cellufine GH, Cellufine GCL (que se fabrican por JNC Corp.), Trisacryl GF05, Trisacryl GF2000, Ultrogel AcA (que se fabrican por Pall Corp.), o Fractogel BioSEC (fabricado por Merck millipore Corp.), o similares, pero no se limitan a los mismos.

El soporte de interacción hidrófoba puede ser un soporte que se prepara inmovilizando directa o indirectamente una molécula hidrófoba, por ejemplo, grupo metilo, grupo etilo, grupo propilo, grupo isopropilo, grupo butilo, grupo

terc-butilo, grupo octilo, grupo éter, grupo fenilo, o similar, sobre el soporte base anterior, y ejemplos específicos del mismo pueden incluir Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-sub), Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low-sub), Octyl Sepharose 4 Fast Flow, Butyl Sepharose 4 Fast Flow (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), TOYOPEARL Hexyl-650, TOYOPEARL Butyl-650, TOYOPEARL Phenyl-650, TOYOPEARL Ether-650, TOYOPEARL PFG-600, TOYOPEARL Butyl-600, TOYOPEARL Super Butyl-550 (que se fabrican por TOSOH Corp.), Mactro-Prep t-Butyl, Macro-Prep Methyl (que se fabrican por Bio-Rad Inc.), QMA Spherosil, Methyl Ceramic HyperD (que se fabrican por Pall Corp.), Fractogel Phenyl(S), Fractogel Propyl(S) (que se fabrican por Merck millipore Corp.), phenyl-Cellufine (fabricado por JNC Corp.), DIAION HP, DIAION SP (que se fabrican por Mitsubishi Chemical Corp.), butylated Chitopearl, phenylated Chitopearl (que se fabrican por FUJIBO Holdings, Inc.), o similares.

El soporte de fase inversa puede ser, por ejemplo, un soporte que se prepara inmovilizando directa o indirectamente un grupo hidrocarbonado sobre una matriz de fase sólida. Los ejemplos del grupo hidrocarbonado pueden incluir un grupo trimetilo, un grupo butilo, un grupo fenilo, un grupo octilo, un grupo octadecilo, un grupo funcional modificado en el extremo del mismo, o similares. Ejemplos específicos del mismo pueden incluir la serie RESOURCE RPC, la serie SOURCE RPC (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), o similares, pero no están limitados a los mismos.

Los ejemplos del soporte de hidroxapatita pueden incluir CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I, Type II (que se fabrican por Bio-Rad Inc.), o similares, pero no están limitados al mismo. Además, los ejemplos del soporte de fluoroapatita pueden incluir CFT Ceramic Fluoroapatite (fabricado por Bio-Rad Inc.) o similares, pero no se limitan al mismo.

Los ejemplos del soporte de sulfato de celulosa o el soporte de sulfato de agarosa pueden incluir Cellufine sulfate, Cellufine sulfate m, Cellufine sulfate c, Cellulofine sulfate m, Cellulofine sulfate c, Cellufine sulfate m or Cellufine sulfate c (que se fabrican por JNC Corp.), Capto DeVirS (fabricado por GE Healthcare Ltd., Inc.), o similares, pero se limitan a los mismos.

El soporte multimodal puede ser un soporte que se prepara inmovilizando directa o indirectamente dos o más tipos de grupos funcionales que presentan selectividad diferente, preferentemente, el grupo de intercambio iónico anterior y el grupo de interacción hidrófoba anterior, sobre el soporte base anterior, y ejemplos específicos del mismo pueden incluir Capto adhere, Capto MMC (que se fabrican por GE Healthcare Ltd., Inc.), HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel (que se fabrican por Pall Corp.), TOYOPEARL MX-Trp-650M (fabricado por TOSOH Corp.), o similares, pero no se limitan a los mismos.

En la presente invención, si la proteína es un anticuerpo, la disolución acuosa que contiene una proteína puede ser preferentemente una disolución acuosa que contiene una proteína que se obtiene sin usar cromatografía de afinidad, y más preferentemente, una disolución acuosa que contiene una proteína que se obtiene sin usar cromatografía de afinidad de proteína A.

Además, si los materiales insolubles, tales como partículas o similares, están presentes en la disolución acuosa que contiene una proteína, se eliminan de antemano, y la disolución libre de insolubles resultante se puede proporcionar en el método de purificación de la presente invención. Los ejemplos del método para eliminar materiales insolubles tales como partículas pueden incluir centrifugación, filtración de flujo cruzado (filtración de flujo tangencial), filtración usando un filtro de profundidad, filtración usando un filtro de membrana, diálisis, o combinaciones de los mismos. Si es necesario, se ajusta el pH, la conductividad, el amortiguador, la concentración de proteína de la disolución acuosa que contiene proteína, o la cantidad de adición de proteína por unidad de volumen de carbón activado, y entonces se puede proporcionar la disolución acuosa resultante que contiene proteína en el método de purificación de la presente invención.

Los ejemplos del método para ajustar el pH, la conductividad, el amortiguador, la concentración de proteína, o la cantidad de adición de proteína por unidad de volumen del carbón activado pueden incluir ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración o similar.

La membrana de ultrafiltración incluye una membrana de ultrafiltración cargada positiva o negativamente, además de las membranas de ultrafiltración típicas, y ejemplos específicos de las mismas pueden incluir la membrana Pellicon 3 Ultracel, la membrana Pellicon 3 biomax, la membrana Pellicon 2 Ultracel, la membrana Pellicon 2 biomax (que son fabricadas por Merck millipore Corp.), la membrana omega (fabricada por Pall Corp.), la membrana Kwick (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc.), o similares, pero no se limitan a las mismas.

En la presente invención, las impurezas pueden incluir proteínas de la célula hospedadora (HCP), polímeros derivados de proteínas, productos de degradación derivados de proteínas, productos de modificación derivados de proteínas resultantes de la desnaturalización, eliminación de componentes de la cadena de azúcar, oxidación, desamidación, o similares, ADN, componentes derivados del medio, aditivos de cultivo o enzimas segregadas por las células hospedadoras, y preferentemente proteínas de la célula hospedadora, polímeros derivados de proteínas, productos de degradación derivados de proteínas, o ADN.

Los ejemplos de las enzimas segregadas por las células hospedadoras pueden incluir enzimas glicolíticas, enzimas proteolíticas, enzimas de oxidación/reducción, o similares.

Los ejemplos específicos de las enzimas glicolíticas pueden incluir neuraminidasa (sialidasa), galactosidasa, glicanasa, o similares. Los ejemplos específicos de las enzimas proteolíticas pueden incluir serina proteasa, esterasa, cisteína proteasa, proteasa similar a la tripsina, aminopeptidasa, proteasa aspártica, catepsina, o similares. Los ejemplos específicos de las enzimas de oxidación/reducción pueden incluir enzimas relacionadas con la tiorredoxina tales como la tiorredoxina reductasa, o similares. Los ejemplos específicos de la enzima isomerizante de aminoácidos pueden incluir transglutaminasa, o similares.

El carbón activado usado en el método de purificación de la presente invención puede ser cualquiera, siempre que sea adecuado para la preparación del fármaco, y un tipo de carbón activado puede usarse solo, o dos o más tipos de carbón activado pueden usarse solos o en combinación.

Los ejemplos del carbón activado pueden incluir carbón activado a base de minerales, carbón activado a base de plantas, o similares. Los ejemplos específicos del carbón activado a base de minerales pueden incluir carbón activado a base de carbón, carbón activado a base de petróleo, o similares, y ejemplos específicos del carbón activado a base de plantas pueden incluir carbón activado a base de madera, carbón activado a base de cáscara de coco, o similares, y preferentemente carbón activado a base de madera.

La materia prima del carbón activado puede ser cualquiera, siempre que sea carbonosa, y sus ejemplos pueden incluir materiales de madera tales como aserrín, carbón, cenizas, turba, astillas o astillas de madera, cáscara de coco, carbones tales como lignito, carbón marrón o antracita, brea de carbón, brea de petróleo, carbón de aceite, rayón, resina de acrilonitrilo o de fenol, o similares.

El método de preparación del carbón activado no está particularmente limitado, pero los ejemplos del mismo pueden incluir un método de activación de líquido químico para añadir y penetrar una sustancia química como cloruro de cinc o ácido fosfórico a una temperatura alta y realizar la carbonización a una temperatura alta, o un método de activación de gas para hacer reaccionar materias primas carbonizadas y gases tales como vapor de agua, dióxido de carbono, aire o gas de combustión a alta temperatura.

La forma del carbón activado puede ser cualquiera, siempre que sea adecuada para la preparación del fármaco, y los ejemplos de la misma pueden incluir una forma de partículas de carbón activado, tal como carbón pulverizado, carbón granular, carbón esférico, carbón en pelete, o similares, una forma fibrosa de carbón activado tal como fibra, fibra cruzada, o similar, una forma especializada de carbón activado tal como una forma de lámina, un compacto, una forma de panal, o similar, carbón activado en polvo, o similar.

El carbón activado cargado positiva o negativamente o el carbón activado modificado con un modificador de superficie tal como polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), heparina, celulosa, poliuretano, o similares, asimismo pueden incluirse en el carbón activado de la presente invención.

Un diámetro medio de microporos del carbón activado puede ser, pero no está particularmente limitado a, típicamente 0.1 a 20 nm, preferentemente 0.5 a 5 nm, y más preferentemente 1 a 3 nm.

Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Carboraffin, SHIRASAGI fuerte, SHIRASAGI purificado, SHIRASAGI especializado, SHIRASAGI A, SHIRASAGI C, SHIRASAGI C-1, SHIRASAGI DO-2, SHIRASAGI DO-5, SHIRASAGI DO-11, SHIRASAGI DC, SHIRASAGI DO, SHIRASAGI Gx, SHIRASAGI G, SHIRASAGI GH, SHIRASAGI FAC-10, SHIRASAGI M, SHIRASAGI P, SHIRASAGI PHC, SHIRASAGI Gc, SHIRASAGI GH, SHIRASAGI GM, SHIRASAGI GS, SHIRASAGI GT, SHIRASAGI GAA, SHIRASAGI GOC, SHIRASAGI GOX, SHIRASAGI APRC, SHIRASAGI TAC, SHIRASAGI MAC, SHIRASAGI XRC, SHIRASAGI NCC, SHIRASAGI SRCX, SHIRASAGI Wc, SHIRASAGI LGK, SHIRASAGI KL, SHIRASAGI WH, SHIRASAGI W, SHIRASAGI WHA, SHIRASAGI LH, SHIRASAGI KL, SHIRASAGI LGK, SHIRASAGI MAC-W, SHIRASAGI S, SHIRASAGI Sx, SHIRASAGI X2M, SHIRASAGI X7000, SHIRASAGI X7100, SHIRASAGI DX7-3, MOLSIEVON (que se fabrican por Japan EnviroChemicals, Ltd.), ACF, Taiko (que se fabrican por Fuji Chemical Corp.), GLC (fabricado por KURARAY CHEMICAL CO., Ltd.), Taiko S, Taiko K, Taiko Q (que se fabrican por FUTAMURA Chemical CO., Ltd.), GAC, CN, CG, CAP/CGP, SX, CA (que se fabrican por Norit Japan Co., Ltd.), o similares.

Los ejemplos de los medios del método de purificación de la presente invención pueden incluir, pero no están particularmente limitados a, un método discontinuo, un método de tratamiento de membrana, cromatografía en columna, o similares. Dependiendo de cada medio, se selecciona una forma adecuada del carbón activado. Si es necesario, una forma de partícula o similar preparada encapsulando el carbón activado en un polímero poroso o un gel, una membrana o forma de cartucho o similar preparada adsorbiendo, fijando o moldeando el carbón activado usando un soporte tal como polipropileno o celulosa, o fibra, o similar. Ejemplos específicos de los mismos pueden incluir un cartucho de filtro de carbón activado CUNO, un cartucho de filtro de carbón activado Zeta plus (fabricado por Sumitomo 3M Ltd.), un filtro de carbón activado Millistak + (fabricado por Merck millipore Corp.), un filtro SUPRA AKS (fabricado por Pall Corp.), Adol (fabricado por UNITIKA Ltd.), un filtro K, una lámina de carbón

activado (que están fabricados por TOYOBO CO., Ltd), Hemax (fabricado por KURARAY Co., Ltd.), Hemosorba (fabricado por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), Hemocolumn (fabricado por TERUMO Corp.), Hecellose (fabricado por TEIJIN Ltd.), o similares.

- 5 Dependiendo de la proteína de interés y los medios del método de purificación, se puede seleccionar adecuadamente la densidad de empaquetamiento, granularidad, rigidez, pérdida de secado, residuo por ignición, área de superficie específica, volumen de poro, o pH, o similares, del carbón activado usado.

10 El método de purificación de la presente invención se lleva a cabo preferentemente en un modo de no adsorción. El modo de no adsorción significa que la disolución acuosa que contiene una proteína se pone en contacto con el carbón activado, y la proteína de interés no se adsorbe sobre el carbón activado para recuperar una fracción de no adsorción. En detalle, el pH, la conductividad, el amortiguador, la concentración de proteína de la disolución acuosa que contiene una proteína, la cantidad de adición de proteínas por unidad de volumen del carbón activado, la temperatura, o el tiempo de contacto con el carbón activado se ajustan por adelantado, y entonces se pone en contacto con el carbón activado. De este modo, la proteína de interés no se adsorbe sobre el carbón activado, pero las impurezas se adsorben sobre el carbón activado, recuperando así la fracción de no adsorción que presenta la proteína con un bajo contenido de impurezas.

20 El pH de la disolución acuosa que contiene una proteína que se pondrá en contacto con el carbón activado es 4 a 5. Además, los ejemplos de la sal que constituye la disolución acuosa que contiene una proteína pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris(base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares. La concentración de las mismas es preferentemente 0.01 mol/l a 0.5 mol/l. Por ejemplo, estas sales asimismo pueden usarse en combinaciones de 0.01 mol/l a 0.5 mol/l, preferentemente de 0.01 mol/l a 0.5 mol/l de otras sales, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, o similares. Los componentes del amortiguador, por ejemplo aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, azúcares tales como glucosa, sacarosa, lactosa, ácido siálico, o similares, o derivados de los mismos, pueden usarse en combinaciones.

30 La temperatura de la disolución acuosa que contiene una proteína a poner en contacto con el carbón activado es preferentemente de 4°C a 60°C, más preferentemente de 10°C a 50°C, y mucho más preferentemente de 20°C a 40°C.

35 En la presente invención, se recupera la fracción de no adsorción del carbón activado, para obtener la proteína con un bajo contenido de impurezas con un alto rendimiento. En detalle, con respecto al contenido de impurezas, el contenido de las proteínas de la célula hospedadora es preferentemente 100000 ng o menos por 1 mg de la proteína, más preferentemente 10000 ng o menos por 1 mg de la proteína, y mucho más preferentemente 1000 ng o menos por 1 mg de la proteína, el contenido de los polímeros derivados de proteínas es preferentemente 5% o menos, más preferentemente 4% o menos, y mucho más preferentemente 3% o menos, el contenido de los productos de degradación derivados de proteína es preferentemente 10% o menos, más preferentemente 5% o menos, mucho más preferentemente 4% o menos, y todavía más preferentemente 3% o menos. La tasa de recuperación es preferentemente 50% o mayor, más preferentemente 60% o mayor, y la tasa de reducción de las proteínas de la célula hospedadora (HCP LRV) es preferentemente 1 o mayor, más preferentemente 1.5 o mayor, y mucho más preferentemente 2 o mayor.

45 En la presente invención, la tasa de recuperación de la proteína con un bajo contenido de impurezas y el contenido de impurezas pueden determinarse mediante el método de análisis típicamente usado para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la tasa de recuperación puede determinarse por HPLC de absorbancia o afinidad, tal como la proteína A, el contenido de las proteínas de la célula hospedadora puede determinarse por ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzimas), transferencia Western, un ensayo de electroquimioluminiscencia, o similar, el contenido de los polímeros derivados de proteínas o de los productos de degradación derivados de proteínas puede determinarse mediante HPLC de filtración en gel, HPLC de intercambio iónico, electroforesis en gel de poliacrilamida, un método de dispersión de luz, un método ultracentrífugo, o similar, los ADN se determinaron por Pico-green, Threshold, QPCR, o similar.

55 Además, la presente invención se refiere a un método para preparar una proteína, que comprende la etapa de separar la proteína de las impurezas usando el carbón activado para obtener la proteína con un bajo contenido de impurezas.

60 En el método de preparación de la presente invención, un método de purificación que se debe usar en combinación con el carbón activado puede ser cualquiera siempre que sea adecuado para la preparación del fármaco, y ejemplos del mismo pueden incluir cromatografía, fracción de alcohol, eliminación de precipitados, precipitación por sal, intercambio de amortiguador, concentración, dilución, filtración, inactivación de virus, eliminación de virus, o similares. Estos métodos de purificación que se deben utilizar en combinación con el carbón activado pueden usarse en combinaciones de una pluralidad de tipos y números de los mismos. El método de purificación que se debe utilizar en combinación con el carbón activado puede llevarse a cabo antes o después del método de purificación que usa el carbón activado.

65

5 El soporte o la membrana usado/a en la cromatografía que se debe utilizar en combinación con el carbón activado puede incluir aquellos similares al soporte de afinidad mencionado anteriormente, un soporte de intercambio iónico, una membrana de intercambio iónico, un soporte de filtración en gel, un soporte de interacción hidrófoba, un soporte de fase inversa, un soporte de hidroxiapatita, un soporte de fluoroapatita, un soporte de sulfato de celulosa, un soporte de sulfato de agarosa, un soporte multimodal, o similar.

10 En la presente invención, si la proteína es un anticuerpo, la cromatografía que se debe utilizar en combinación con el carbón activado puede ser preferentemente un método de preparación que no comprende cromatografía de afinidad, y más preferentemente un método de preparación que no comprende cromatografía de afinidad de proteína A. Si la proteína es un anticuerpo, los ejemplos de la cromatografía que se debe utilizar en combinación con el carbón activado pueden incluir cromatografía de intercambio iónico, cromatografía multimodal, o combinaciones de las mismas.

15 La cromatografía que se debe utilizar en combinación con el carbón activado puede llevarse a cabo en un modo de adsorción o en un modo de no adsorción, dependiendo del fin. Preferentemente, por lo menos una de las cromatografías que se deben utilizar en combinación con el carbón activado se lleva a cabo en el modo de adsorción.

20 El modo de adsorción en la cromatografía significa que una disolución acuosa proporcionada en la cromatografía se pone en contacto con el soporte o membrana correspondiente, la proteína de interés se adsorbe sobre el soporte o membrana correspondiente, si es necesario, se realiza el lavado, y entonces la proteína de interés se eluye usando un amortiguador cuyo pH, conductividad, componentes del amortiguador, concentración de sal o aditivo, o similar, se altera, recuperando así la fracción de adsorción. El modo de no adsorción en la cromatografía significa que una disolución acuosa proporcionada en la cromatografía se pone en contacto con el soporte o membrana correspondiente, la proteína de interés no se adsorbe sobre el soporte o membrana correspondiente, recuperando así la fracción de no adsorción.

30 En el método de purificación de proteínas de la presente invención, todas las cromatografías que se deben utilizar en combinación con el carbón activado pueden ser, por ejemplo, un método de purificación de proteínas que se lleva a cabo en el modo de no adsorción (cromatografía totalmente negativa).

35 En la presente invención, si la proteína es un anticuerpo, se lleva a cabo el método de purificación usando el carbón activado y, posteriormente, se realiza la cromatografía de intercambio iónico en modo de no adsorción, seguida de la cromatografía de intercambio catiónico en modo de adsorción, o se lleva a cabo el método purificación usando el carbón activado y, posteriormente, se lleva a cabo la cromatografía de intercambio catiónico en modo de adsorción, seguida de la cromatografía de intercambio aniónico en modo de no adsorción.

40 Las condiciones de la disolución acuosa proporcionada en la cromatografía que se debe utilizar en combinación con el carbón activado o el amortiguador usado en el lavado se seleccionan adecuadamente con respecto al pH, conductividad, componentes del amortiguador, concentración de sal, aditivos, o similares.

45 En la selección de las condiciones cromatográficas, pueden usarse diferencias en las características fisicoquímicas entre la proteína de interés y los compuestos que se desean separar, por ejemplo diferencias en el punto isoeléctrico, carga, hidrofobia, tamaño molecular, o estructura estérica, o similares. El método de elución del modo de adsorción puede incluir un método de elución de una etapa que usa un amortiguador que tenga una concentración de sal o pH específico para reducir la afinidad entre la proteína de interés y el soporte, un método por etapas que eluye la proteína de interés cambiando la concentración de sal o el pH de una manera por etapas, o un método de gradiente que eluye la proteína de interés cambiando continuamente la concentración de sal o el pH.

50 Los ejemplos de la sal que constituye el amortiguador pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris(base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares. Estas sales pueden usarse en combinaciones con otras sales, por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, o sulfato de amonio. Los componentes del amortiguador, por ejemplo aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, o histidina, o similares, azúcares tales como glucosa, sacarosa, lactosa, ácido siálico, o similares, o derivados de los mismos, o similares, pueden usarse en combinaciones.

60 En el método de preparación de la presente invención, la proteína con un bajo contenido de impurezas se puede obtener en una alta tasa de recuperación. En detalle, con respecto al contenido de impurezas, el contenido de las proteínas de la célula hospedadora es preferentemente 100 ng o menos por 1 mg de la proteína, y más preferentemente 10 ng o menos por 1 mg de la proteína, el contenido de los polímeros derivados de proteínas es preferentemente 3.5% o menos, y más preferentemente 1% o menos, el contenido de los productos de degradación derivados de proteínas es preferentemente 3.5% o menos, y más preferentemente 1% o menos. La tasa de recuperación es preferentemente 30% o más, y más preferentemente 40% o más.

65

En adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: purificación 1 de Mab A (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)**

10 Aproximadamente 600 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab A) que previamente se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación y un filtro. La disolución clarificada resultante se neutralizó con una disolución de Tris, y se concentró hasta aproximadamente 6 veces usando una membrana Pellicon 3 Ultracel (fabricada por millipore Corp., 30 kD, 0.11 m²). Después de la concentración, el amortiguador se intercambi

15 Posteriormente, la purificación de Mab A que comprende carbón activado se llevó a cabo en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución resultante concentrada/intercambiada con amortiguador se hizo pasar a través de un filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbono Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado A.

20 El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx20 cm) que se equilibró con un amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se combinó como un eluido de Q Sepharose.

25 Se añadieron aproximadamente 10 mmol/l de citrato de sodio al eluido de Q Sepharose resultante, y se ajustó a pH 7.0 con ácido clorhídrico, y entonces se aplicó a una columna de cromatografía multimodal (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Capto adhere, 10 mm IDx20 cm) que se equilibró con un amortiguador de equilibrio preparado ajustando 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0) a pH 7.0 con una disolución de ácido cítrico. Después de completar la aplicación, el amortiguador de equilibrio se hizo pasar a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Capto adhere.

35 El eluido de Capto adhere resultante se ajustó a pH 4.5 con ácido acético, y entonces se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbono Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B. El eluido de carbón activado resultante B se usó como un producto purificado Mab A final.

40 Los contenidos de polímeros y productos de degradación en el producto purificado Mab A final se analizaron mediante HPLC de filtración en gel, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora en ellos se analizó mediante ELISA.

45 Los resultados del análisis del producto purificado Mab A final se muestran en las figuras 1, 2, y 3. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab A, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

50 **Ejemplo 2: purificación 1 de Mab B (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)**

Aproximadamente 600 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab B) que previamente se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación y un filtro. La disolución clarificada resultante se neutralizó con una disolución de Tris, y se concentró hasta aproximadamente 6 veces usando la membrana Pellicon 3 Ultracel (fabricada por millipore Corp., 30 kD, 0.11 m²). Después de la concentración, el amortiguador se intercambi

55 Posteriormente, la purificación de Mab B que comprende carbón activado se llevó a cabo en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución resultante concentrada/intercambiada con amortiguador se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado A.

60 El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose A.

65 Se añadieron aproximadamente 10 mmol/l de citrato de sodio al eluido de Q Sepharose resultante A, y se ajustó a

pH 7.0 con ácido clorhídrico, y entonces se aplicó a la columna de cromatografía multimodal (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Capto adhere, 10 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio preparado ajustando 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0) a pH 7.0 con la disolución de ácido cítrico. Después de completar la aplicación, el amortiguador de equilibrio se hizo pasar a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Capto adhere.

El eluido de Capto adhere resultante se ajustó a pH 4.5 con ácido acético, y entonces se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbono Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B.

El eluido de carbón activado resultante B se ajustó a pH 8.0 con la disolución de Tris, y entonces se filtró usando un filtro para obtener un filtrado. El filtrado resultante se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose B. El eluido de Q Sepharose B resultante se usó como un producto purificado Mab B final.

Los contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora en el producto purificado de Mab B final se analizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados del análisis del producto purificado de Mab B final se muestran en las figuras 1, 2, y 3. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab B, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

Ejemplo 3: purificación 1 de Mab C (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)

Aproximadamente 600 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab C) que se clarificaron previamente por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación y un filtro. La disolución clarificada resultante se neutralizó con una disolución de Tris, y se concentró hasta aproximadamente 6 veces usando la membrana Pellicon 3 Ultracel (fabricada por millipore Corp., 30 kD, 0.11 m²). Después de la concentración, el amortiguador se intercambió con 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.1) para obtener una disolución concentrada/intercambiada con amortiguador.

Posteriormente, la purificación de Mab C que comprende carbón activado se realizó en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución resultante concentrada/intercambiada con amortiguador se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de profundidad cargado Zeta plus EXT, 25 cm²) y se reunió como un eluido de carbón activado A.

El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.1). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose.

Se añadieron aproximadamente 10 mmol/l de ácido cítrico/citrato de sodio a la disolución reunida de Q Sepharose resultante, y se ajustó a pH 6.0 con ácido clorhídrico, y entonces se aplicó a la columna de cromatografía multimodal (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Capto adhere, 10 mm IDx20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio preparado ajustando 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.1) a pH 6.0 con la disolución de ácido cítrico. Después de completar la aplicación, el amortiguador de equilibrio se hizo pasar a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Capto adhere.

El eluido de Capto adhere resultante se ajustó a pH 4.5 con ácido acético, y entonces se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbono Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B. El eluido de carbón activado resultante B se usó como un producto final purificado de Mab C.

Los contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora en el producto purificado de Mab C final se analizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados del análisis del producto purificado de Mab C final se muestran en las figuras 1, 2, y 3. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab C, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

Ejemplo 4: purificación 2 de Mab A (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)

Aproximadamente 100 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab A) que se clarificaron previamente por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación para obtener una disolución clarificada.

Posteriormente, la purificación de Mab A que comprende carbón activado se realizó en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución clarificada resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado A.

El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por millipore Corp., ProRes S, 3 mm IDx20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 4.5). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 7 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de ProRes S.

El eluido de ProRes S resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B.

El eluido de carbón activado resultante B se diluyó 4 veces usando 5 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0) y entonces se neutralizó con la disolución de Tris, y se filtró usando un filtro. Posteriormente, el filtrado se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose. El eluido de Q Sepharose resultante se usó como un producto purificado de Mab A final.

Los contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora en el producto purificado de Mab A final se analizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados del análisis del producto purificado de Mab A final se muestran en las figuras 4, 5, y 6. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab A, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

Ejemplo 5: purificación 2 de Mab B (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)

Aproximadamente 100 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab B) que previamente se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación para obtener una disolución clarificada.

Posteriormente, la purificación de Mab B que comprende carbón activado se llevó a cabo en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución clarificada resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado A.

El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por millipore Corp., ProRes S, 3 mm IDx20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 4.5). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 7 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de ProRes S.

El eluido de ProRes S resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B.

El eluido de carbón activado resultante B se diluyó 4 veces usando 5 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0) y entonces se neutralizó con la disolución de Tris, y se filtró usando un filtro. Posteriormente, el filtrado se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose. El eluido de Q Sepharose resultante se usó como un producto purificado de Mab B final.

Los contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora en el producto purificado de Mab B final se analizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados del análisis del producto purificado de Mab B final se muestran en las figuras 4, 5, y 6. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab B, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

Ejemplo 6: purificación 2 de Mab C (purificación en modo de no adsorción que comprende carbón activado)

Aproximadamente 100 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab C) que previamente se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación para obtener una disolución clarificada.

Posteriormente, la purificación de Mab C que comprende carbón activado se llevó a cabo en un modo de no adsorción mediante el siguiente procedimiento. Primero, la disolución clarificada resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado A.

El eluido de carbón activado resultante A se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por millipore Corp., ProRes S, 3 mm IDx20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 4.5). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. Una parte de la fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de ProRes S.

El eluido de ProRes S resultante se hizo pasar a través del filtro de carbón activado (fabricado por CUNO Ltd., filtro de carbón Zeta, 25 cm²), y se reunió como un eluido de carbón activado B.

El eluido de carbón activado resultante B se diluyó 4 veces usando 5 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0) y entonces se neutralizó con la disolución de Tris, y se filtró usando un filtro. Posteriormente, el filtrado se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 11 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose. El eluido de Q Sepharose resultante se usó como un producto purificado de Mab C final.

Los contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora en el producto purificado de Mab C final se analizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados del análisis del producto purificado de Mab C final se muestran en las figuras 4, 5, y 6. Según el presente método de purificación, se pudo obtener el producto purificado de Mab C, en el que los contenidos de polímeros y productos de degradación fueron menores que 1%, respectivamente, y el contenido de proteínas de la célula hospedadora fue menor que 10 ng/mg.

Ejemplo 7: purificación 3 de Mab A (purificación que comprende carbón activado)

Aproximadamente 200 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab A) que se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación para obtener una disolución clarificada A.

Posteriormente, se añadió carbón activado (fabricado por Japan EnviroChemicals, Ltd, SHIRASAGI P) a aproximadamente 60 ml de la disolución clarificada resultante A, y se mezcló. Posteriormente, la mezcla se sometió a centrifugación y filtración usando un filtro, para obtener un eluido de carbón activado.

El eluido de carbón activado resultante se diluyó 4 veces usando 5 mmol/l de amortiguador Tris, y entonces se ajustó a pH 8.0 con la disolución de Tris. Posteriormente, el resultante se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose.

El eluido de Q Sepharose resultante se ajustó a pH 5.0 con la disolución de ácido acético. Posteriormente, el resultante se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por Applied Biosystems, POROS XS, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 5.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. A continuación, la elución se realizó con un gradiente de concentración de sal (10 volúmenes de columna) aumentando gradualmente la concentración de sal en un amortiguador de ácido acético 10 mmol/l (pH 5.0) que contenía 0.3 mol/l de cloruro de sodio. Una parte de

la fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de POROS XS. El eluido de POROS XS se usó como un producto purificado de Mab A final.

Ejemplo 8: purificación 3 de Mab B (purificación que comprende carbón activado)

Aproximadamente 225 ml de sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab B) que se clarificaron por microfiltración se ajustaron a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron por centrifugación para obtener una disolución clarificada B.

Posteriormente, se añadió carbón activado (fabricado por Japan EnviroChemicals, Ltd, SHIRASAGI P) a aproximadamente 60 ml de la disolución clarificada resultante B, y se mezcló. Posteriormente, la mezcla se sometió a centrifugación y filtración, usando un filtro para obtener un eluido de carbón activado.

El eluido de carbón activado resultante se diluyó 4 veces usando 5 mmol/l de amortiguador Tris, y entonces se ajustó a pH 8.0 con la disolución de Tris. Posteriormente, el resultante se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose.

El eluido de Q Sepharose resultante se ajustó a pH 5.1 con la disolución de ácido acético. Posteriormente, el resultante se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por Applied Biosystems, POROS XS, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 5.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio a través de la columna. A continuación, la elución se llevó a cabo con un gradiente de concentración de sal (10 volúmenes de columna) de aumento gradual de la concentración de sal de 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 5.0) que contenía 0.3 mol/l de cloruro de sodio. Una parte de la fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de POROS XS. El eluido de POROS XS se usó como un producto purificado de Mab B final.

Ejemplo 9: análisis del producto purificado de Mab A y del producto purificado de Mab B

El intermedio de purificación de Mab A y el producto purificado final obtenidos en el ejemplo 7 y el ejemplo comparativo 1, y el intermedio de purificación de Mab B y el producto purificado final obtenidos en el ejemplo 8 y el ejemplo comparativo 2 se analizaron como sigue. La tasa de recuperación de cada procedimiento de purificación y la tasa de recuperación total de todo el procedimiento de purificación se analizaron por HPLC de afinidad de proteína A.

Los resultados de la tasa de recuperación de cada procedimiento y la tasa de recuperación total en la purificación mediante proteína A y la purificación mediante carbón activado de Mab A y Mab B se muestran en las figuras 7 y 8. La tasa de recuperación total de la purificación mediante carbón activado fue casi igual a la de la purificación mediante proteína A, y la tasa de recuperación fue tan alta como 40% o más.

Los contenidos de los polímeros y los productos de degradación en el intermedio de purificación y el producto purificado final se analizaron por HPLC de filtración en gel. Con respecto al intermedio de purificación y al producto purificado final en la purificación mediante proteína A y la purificación mediante carbón activado de Mab A y Mab B, los contenidos de los polímeros se muestran en las figuras 9 y 11, y los contenidos de los productos de degradación se muestran en las figuras 10 y 12, respectivamente.

Independientemente del tipo de anticuerpos monoclonales, ambos métodos de purificación mostraron que los contenidos de los polímeros y los productos de degradación en el producto purificado final (cación) fueron equivalentes. Por otra parte, cuando se compararon los contenidos de los polímeros y los productos de degradación entre el procedimiento de purificación mediante proteína A y el procedimiento de purificación mediante carbón activado, el procedimiento de purificación mediante carbón activado mostró menores contenidos de los polímeros y productos de degradación que el procedimiento de purificación mediante proteína A, en el cual los contenidos fueron menores que 2%.

Los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora por 1 mg de proteína en el intermedio de purificación y el producto purificado final se analizaron mediante ELISA. Con respecto a la purificación mediante proteína A y la purificación mediante carbón activado de Mab A y Mab B, los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora por 1 mg de proteína en el intermedio de purificación y el producto purificado final se muestran en las figuras 13 y 14.

Independientemente del tipo de anticuerpos monoclonales, la purificación mediante proteína A y la purificación mediante carbón activado mostraron que los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora fueron equivalentes. Los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora en los productos purificados finales asimismo fueron equivalentes, en los que los contenidos fueron menores que 10 ng/mg de proteína.

Estos resultados mostraron que los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora en los intermedios de purificación fueron equivalentes entre la purificación mediante proteína A y la purificación mediante carbón activado, mientras que la purificación mediante carbón activado mostró menores contenidos de los polímeros y los productos de degradación, lo que indica que las proteínas con contenido mucho menor de impurezas se pueden obtener mediante la purificación mediante carbón activado.

Ejemplo 10: inhibición de la degradación de anticuerpos por carbón activado

El sobrenadante de cultivo celular que contiene anticuerpos monoclonales (Mab B) se ajustó a pH 4.5 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron usando un filtro para obtener una disolución clarificada.

Posteriormente, el carbón activado (fabricado por Japan EnviroChemicals, Ltd, SHIRASAGI P) se añadió a la disolución clarificada resultante, y se mezcló. Después de retener durante 24 horas, el sobrenadante del que se eliminó el carbón activado se proporcionó para el análisis de SDS-PAGE. Como control, la disolución sin adición del carbón activado se manipuló de la misma manera que anteriormente, y se proporcionó para el análisis de SDS-PAGE en condiciones de no reducción.

Los resultados del análisis de SDS-PAGE se muestran en la figura 15. El control (C) mostró bandas más fuertes de los productos de degradación que la disolución clarificada (A), y la adición del carbón activado (B) no causó una banda fuerte de los productos de degradación.

Estos resultados indican que la formación de productos de degradación se inhibió mediante la adición de carbón activado.

Ejemplo 11: inhibición de la reducción de anticuerpos por carbón activado

El carbón activado (fabricado por Japan EnviroChemicals, Ltd, SHIRASAGI P) se añadió al sobrenadante de cultivo celular que contiene anticuerpos monoclonales (Mab D), y se mezcló. Después de eliminar el carbón activado, el sobrenadante se mantuvo en condiciones anaeróbicas durante 24 horas. Después de retener 24 horas, el sobrenadante se proporcionó para el análisis de SDS-PAGE en condiciones de no reducción. Como control, la disolución sin adición del carbón activado se manipuló de la misma manera que anteriormente, y se proporcionó para el análisis de SDS-PAGE.

Los resultados del análisis de SDS-PAGE se muestran en la figura 16. Las bandas (cadena H, cadena L) correspondientes a la reducción de anticuerpos se observaron en el control (C), en comparación con el sobrenadante de cultivo (A), pero no se observaron bandas (cadena H, cadena L) correspondientes a la reducción de anticuerpos en el tratamiento con carbón activado (B).

Estos resultados indican que la formación de productos reducidos se inhibió mediante la adición de carbón activado.

Ejemplo 12: análisis de ADN del producto purificado de Mab A y del producto purificado de Mab B

El análisis de ADN del producto purificado de Mab A final obtenido en el ejemplo 7, el producto purificado de Mab A obtenido en el ejemplo comparativo 1, el producto purificado de Mab B final obtenido en el ejemplo 8, y el producto purificado de Mab B obtenido en el ejemplo comparativo 2 se llevó a cabo por el método Threshold.

Los contenidos de ADN por 1 mg de las proteínas en el producto purificado final de la purificación mediante carbón activado y en el producto purificado de la purificación mediante proteína A con respecto a Mab A y Mab B se muestran en la figura 17. Los contenidos de ADN del producto purificado final y el producto purificado son equivalentes entre ambas purificaciones, en las que los contenidos fueron de 10 pg/mg o menos.

Ejemplo 13: efecto del pH en la purificación mediante carbón activado

Los sobrenadantes de cultivo de células CHO que contienen anticuerpos monoclonales (Mab B) clarificados mediante microfiltración se ajustaron a pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 con un ácido o un álcali, respectivamente. Los precipitados formados se eliminaron mediante un filtro para obtener disoluciones clarificadas de pH ajustado.

Posteriormente, el carbón activado (fabricado por Japan EnviroChemicals, Ltd, SHIRASAGI P) se añadió a aproximadamente 10 ml de cada una de las disoluciones clarificadas de pH ajustado, y se mezcló. Después, cada mezcla se centrifugó para obtener cada eluido de carbón activado. Cada una de las disoluciones clarificadas de pH ajustado sin adición de carbón activado se usó como cada una de control de pH.

Con respecto a cada uno de los eluidos de carbón activado de pH ajustado y cada uno de los controles de pH, los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora por 1 mg de proteína se analizaron mediante ELISA.

Las tasas de reducción de proteínas de la célula hospedadora (HCP LRV) se calcularon usando los contenidos de las proteínas de la célula hospedadora por 1 mg de proteína mediante la siguiente ecuación.

5 (Ecuación) tasa de reducción de la proteína de la célula hospedadora (HCP LRV) = $-\log_{10}$ (contenido de proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína de eluido de carbón activado/contenido de proteína de la célula hospedadora por 1 mg de proteína de control)

10 Las tasas de reducción de proteínas de la célula hospedadora (HCP LRV) a cada pH mediante el tratamiento con carbón activado se muestran en la figura 18. HCP LRV fue 2 o mayor a pH 4 y 5. HCP LRV estaba en el intervalo de 1 ~2 a pH 6, pH 7 y pH 8. Por lo tanto, se encontró que el efecto del tratamiento con carbón activado en la reducción de la proteína de la célula hospedadora fue mayor a pH 4 y 5 que a pH 6, pH 7 y pH 8.

15 La concentración de anticuerpos de cada eluido de carbón activado con pH se analizó mediante HPLC de afinidad de proteína A. Cuando la concentración de anticuerpos del eluido de carbón activado a pH 7 se consideró como 100, la concentración relativa de anticuerpos (%) a cada pH se mostró en la figura 19.

20 La concentración de anticuerpos a pH 4 fue menor que aquella a otro pH, y fue aproximadamente 70% de la concentración de anticuerpos a pH 7. A otro pH, las concentraciones de anticuerpos estaban dentro del intervalo de $\pm 10\%$ de la concentración de anticuerpos a pH 7. Con respecto al tratamiento con carbón activado, las concentraciones relativas de anticuerpos y las tasas de recuperación de anticuerpos a pH 5, pH 6, pH 7 y pH 8 fueron mayores que aquellas a pH 4.

25 Los resultados de las tasas de reducción de las proteínas de la célula hospedadora y las concentraciones relativas de anticuerpos en cada pH sugieren que es posible realizar el tratamiento con carbón activado a cualquier pH de pH 4 a 8, y preferentemente pH 4 a 6.

Ejemplo 14: efecto de la materia prima de carbón activado en la purificación mediante carbón activado

30 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene anticuerpos monoclonales (Mab B) clarificado mediante microfiltración se ajustó a pH 4.6 con ácido acético. Los precipitados formados se eliminaron mediante centrifugación y filtración usando un filtro para obtener una disolución clarificada B.

35 Posteriormente, cada uno de los carbonos activados enumerados en la tabla 1 se añadió a aproximadamente 10 ml de la disolución clarificada resultante B, y se mezcló. Después, las mezclas se sometieron a centrifugación y filtración usando un filtro, para obtener eluidos de carbón activado.

Tabla 1. Listado de carbón activado evaluado

Nombre	Materia prima	Fabricante
SHIRASAGI P	Madera	Japan EnviroChemicals, Ltd.
SHIRASAGI DO-2	Cáscara de coco	Japan EnviroChemicals, Ltd.
SHIRASAGI DO-5	Carbón	Japan EnviroChemicals, Ltd.

40 Los contenidos de los polímeros y los productos de degradación y los contenidos de proteínas de la célula hospedadora en cada uno de los eluidos de carbón activado se analizaron mediante HPLC de filtración en gel y mediante ELISA, respectivamente. Los resultados del análisis de cada eluido de carbón activado se muestran en las figuras 20, 21, y 22.

45 Todos los eluidos de carbón activado obtenidos por SHIRASAGI P, SHIRASAGI DO-2 y SHIRASAGI DO-5 mostraron menores contenidos de polímeros, productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora que el sobrenadante de cultivo. En particular, el eluido de carbón activado obtenido mediante el uso de SHIRASAGI P, cuya materia prima es la madera, mostró contenidos mucho menores de productos de degradación y proteínas de la célula hospedadora que otros carbonos activados.

Ejemplo comparativo 1: purificación de Mab A (purificación que comprende cromatografía de afinidad de proteína A)

55 La disolución clarificada A obtenida en el ejemplo 7 se ajustó a pH 6.4 con la disolución de Tris. Se aplicaron aproximadamente 60 ml de esta disolución a la columna de cromatografía de afinidad de proteína A (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., MabSelect SuRe, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0). Después de completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0) que contenía 1 mol/l de cloruro de sodio y el amortiguador de equilibrio. A continuación, la elución se llevó a cabo usando 5 volúmenes de columna de amortiguador de glicina 100 mmol/l (pH 3.2). La fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de MabSelect SuRe.

5 El eluido de MabSelect SuRe resultante se ajustó a pH 8.0 con la disolución de Tris. Esta disolución se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose.

10 El eluido de Q Sepharose resultante se ajustó a pH 5.0 con la disolución de ácido acético. Esta disolución se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por Applied Biosystems, POROS XS, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 5.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio a través de la columna. A continuación, la elución se realizó con un gradiente de concentración de sal (10 volúmenes de columna) aumentando gradualmente la concentración de sal en amortiguador de ácido acético 10 mmol/l (pH 5.0) que contenía 0.3 mol/l de cloruro de sodio. Una parte de la fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de POROS XS. El eluido de POROS XS se usó como un producto purificado de Mab A final.

Ejemplo comparativo 2: purificación de Mab B (purificación que comprende cromatografía de afinidad de proteína A)

20 La disolución clarificada B obtenida en el ejemplo 8 se ajustó a pH 6.4 con la disolución de Tris. Se aplicaron aproximadamente 60 ml de esta disolución a la columna de cromatografía de afinidad de Proteína A (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., MabSelect SuRe, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0). Después de completar la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 7.0) que contenía 1 mol/l de cloruro de sodio y el 25 amortiguador de equilibrio. A continuación, la elución se llevó a cabo usando 5 volúmenes de columna de amortiguador de glicina 100 mmol/l (pH 3.2). La fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de MabSelect SuRe.

30 El eluido de MabSelect SuRe resultante se ajustó a pH 8.0 con la disolución de Tris. Esta disolución se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare Ltd., Inc., Q Sepharose, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador Tris (pH 8.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio a través de la columna. La fracción no adsorbida de la columna se reunió como un eluido de Q Sepharose.

35 El eluido de Q Sepharose resultante se ajustó a pH 5.0 con la disolución de ácido acético. Esta disolución se aplicó a la columna de cromatografía de intercambio catiónico (fabricada por Applied Biosystems, POROS XS, 5 mm IDx 20 cm) que se equilibró con el amortiguador de equilibrio que consiste en 10 mmol/l de amortiguador de ácido acético (pH 5.0). Después de completar la aplicación, se hicieron pasar 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio a través de la columna. A continuación, la elución se realizó con un gradiente de concentración de sal 40 (10 volúmenes de columna) aumentando gradualmente la concentración de sal en amortiguador de ácido acético 10 mmol/l (pH 5.0) que contenía 0.3 mol/l de cloruro de sodio. Una parte de la fracción eluida de la columna se reunió como un eluido de POROS XS. El eluido de POROS XS se usó como un producto purificado de Mab B final.

45 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a las formas de realización específicas, resultará evidente para los expertos en la materia que se pueden introducir diversas modificaciones y cambios en la misma sin apartarse del alcance y espíritu de la invención.

50 Si bien la presente invención se ha descrito en detalle y haciendo referencia a formas de realización específicas de la misma, resultará evidente para un experto en la materia que se pueden introducir diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la misma. Esta solicitud está basada en la solicitud provisional US (61/680,433), presentada el 7 de agosto de 2012.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para purificar una proteína, en el que la proteína se separa de las impurezas utilizando un carbón activado para obtener la proteína con un bajo contenido de impurezas, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal, en el que el pH de la disolución acuosa que contiene proteína que se debe poner en contacto con el carbón activado es 4 a 5, en el que las impurezas son cualquiera de entre proteínas de célula hospedadora, polímeros derivados de proteínas, productos de degradación derivados de proteínas o ADN y en el que no se utiliza la cromatografía de proteína A.
- 10 2. Método de purificación según la reivindicación 1, en el que la proteína presenta un peso molecular de 30000 o más.
3. Método de purificación según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína es una glucoproteína.
- 15 4. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína es una proteína modificada genéticamente.
- 20 5. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método se lleva a cabo en un modo de no adsorción.
6. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el carbón activado es un carbón activado a partir de madera.
- 25 7. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el carbón activado presenta un diámetro de microporos medio de 0.5 a 5 nm.
8. Método para preparar una proteína, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal, que comprende el método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Método de preparación según la reivindicación 8, que comprende cualquiera de entre cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía multimodal.
- 35 10. Método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que comprende por lo menos una cromatografía en modo de adsorción.
- 40 11. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la disolución acuosa que contiene proteína se obtiene mediante un tratamiento de pH bajo y la eliminación subsiguiente de precipitados, en el que opcionalmente el pH del tratamiento de pH bajo es pH 3 a 6 y se ajusta mediante la adición de un ácido.

FIG. 1

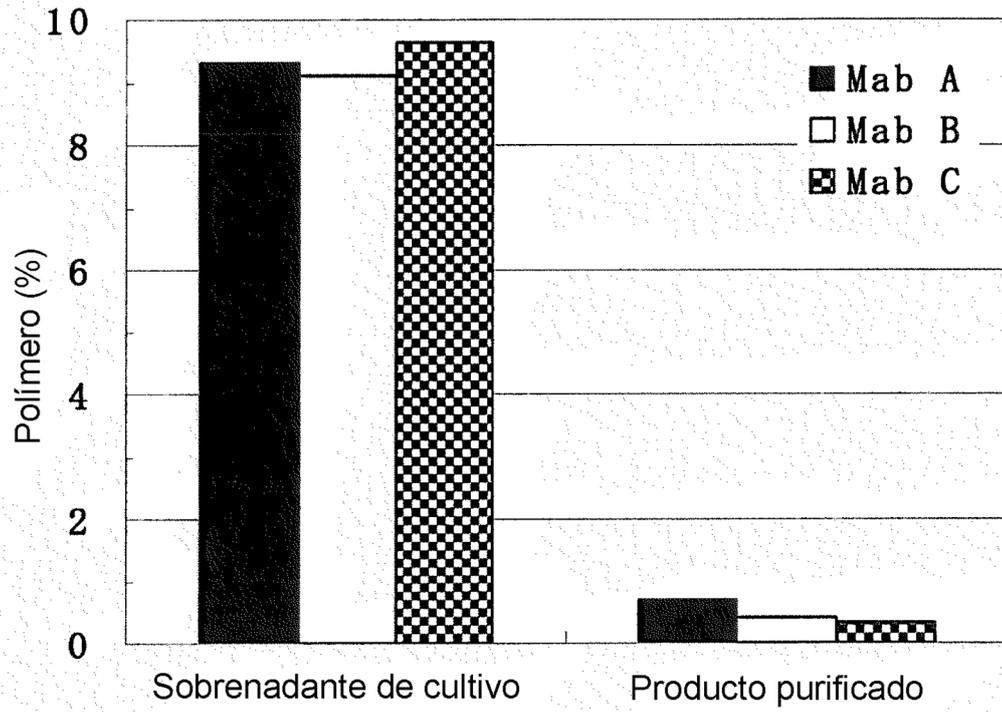


FIG. 2

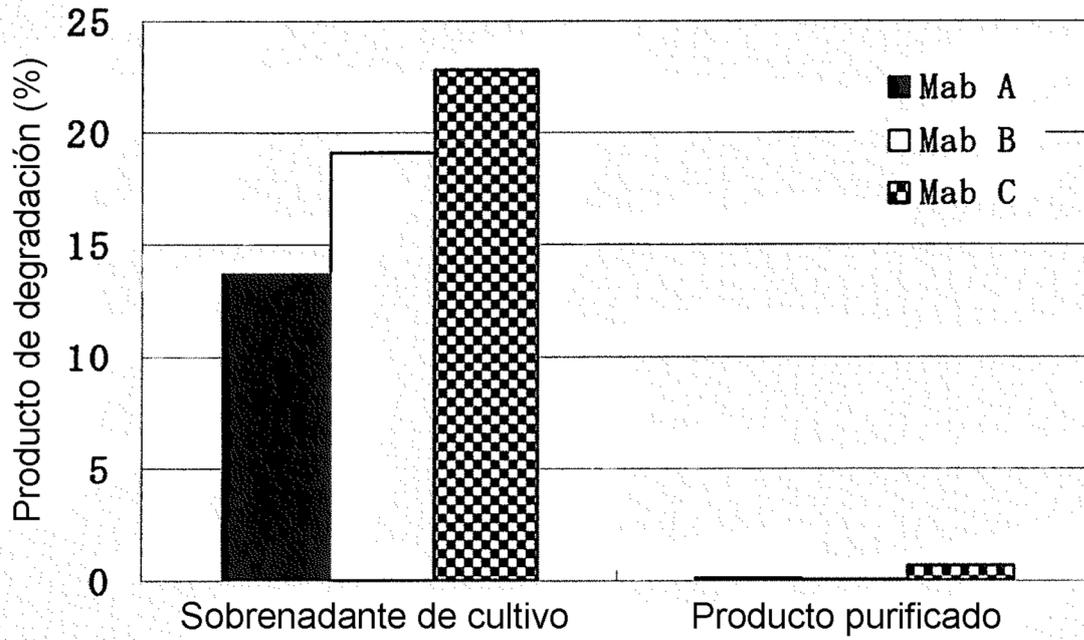


FIG. 3

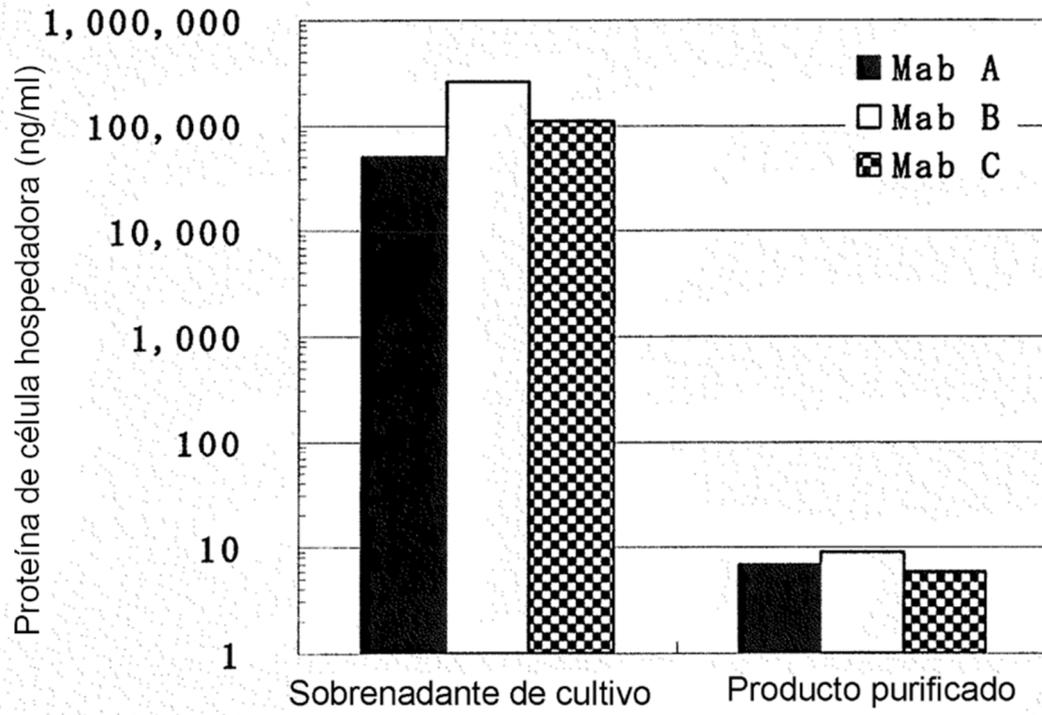


FIG. 4

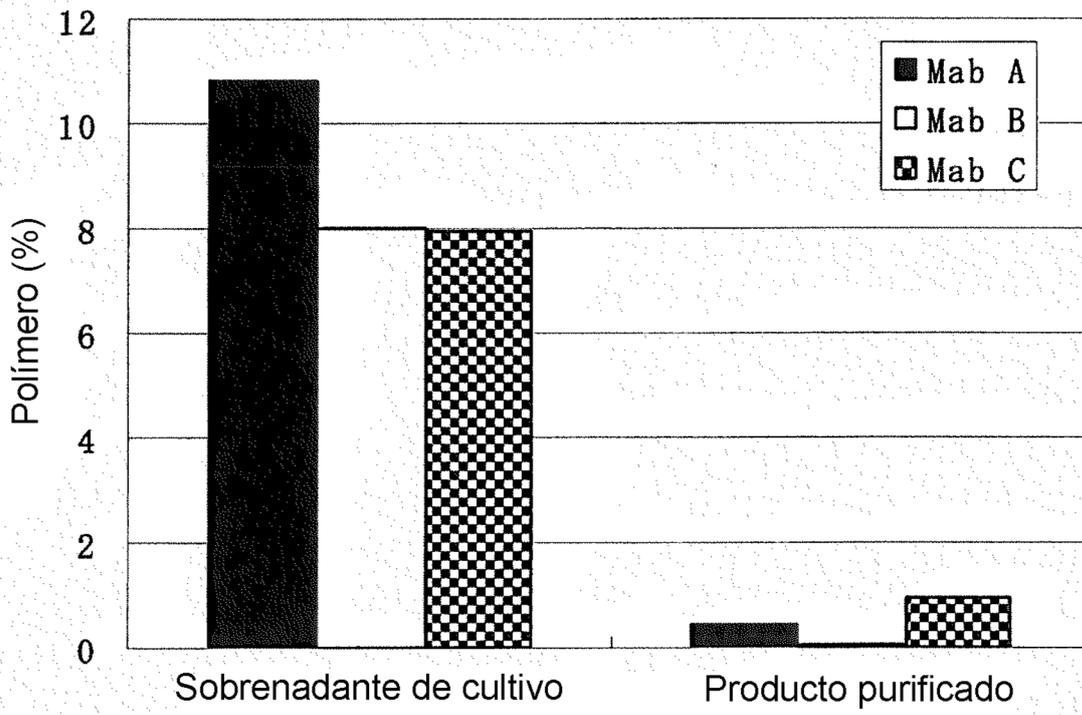


FIG. 5

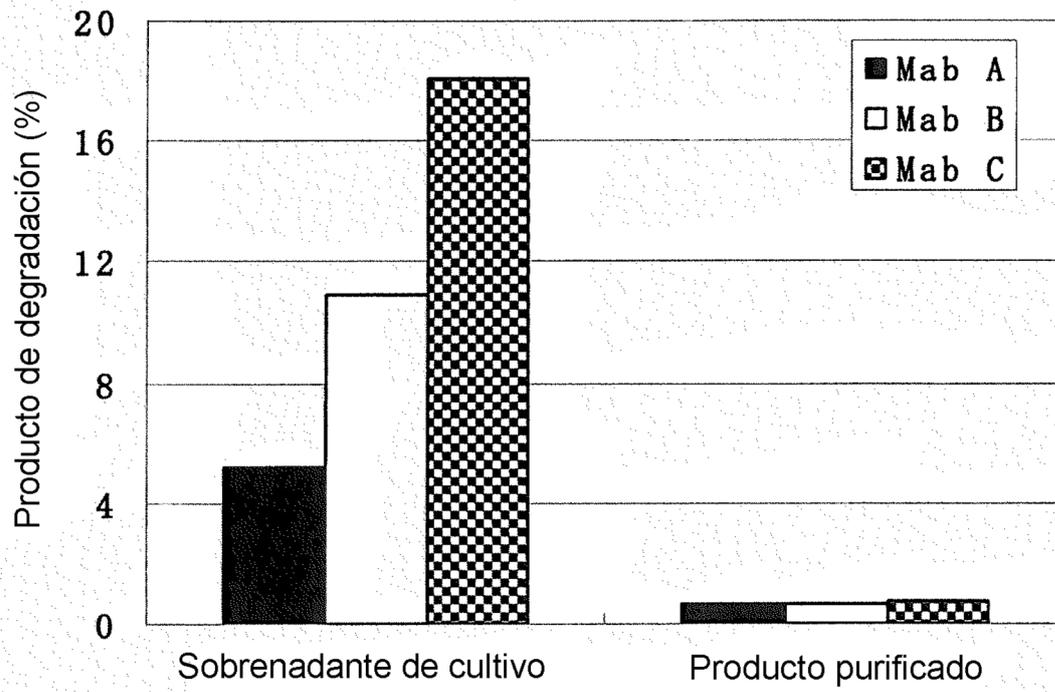


FIG. 6

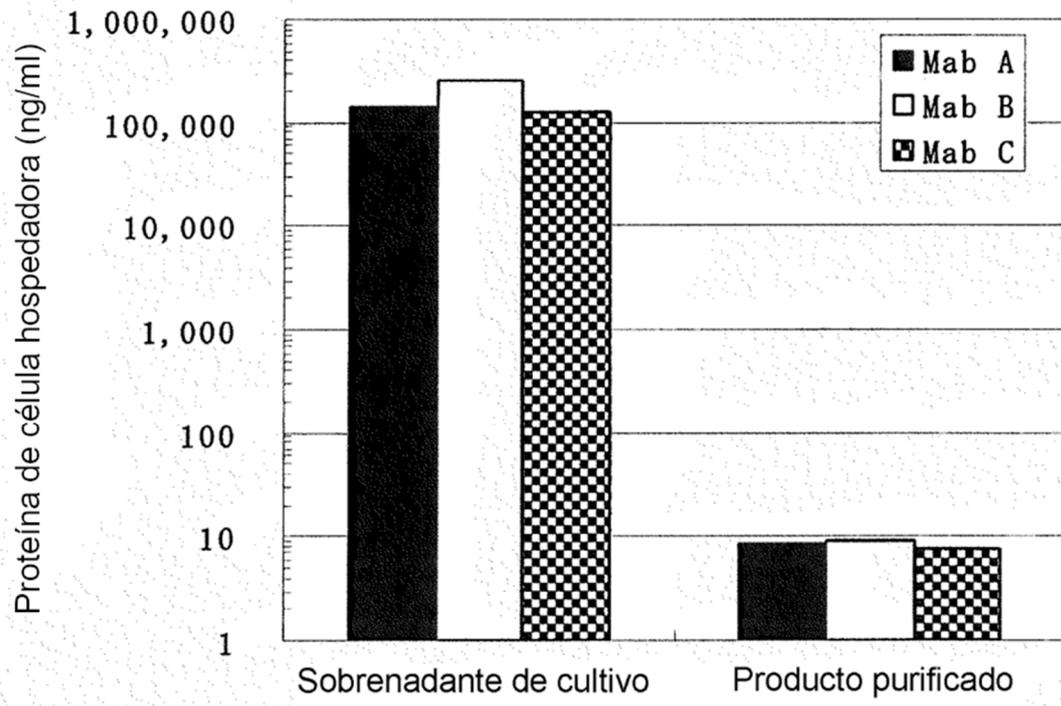


FIG. 7

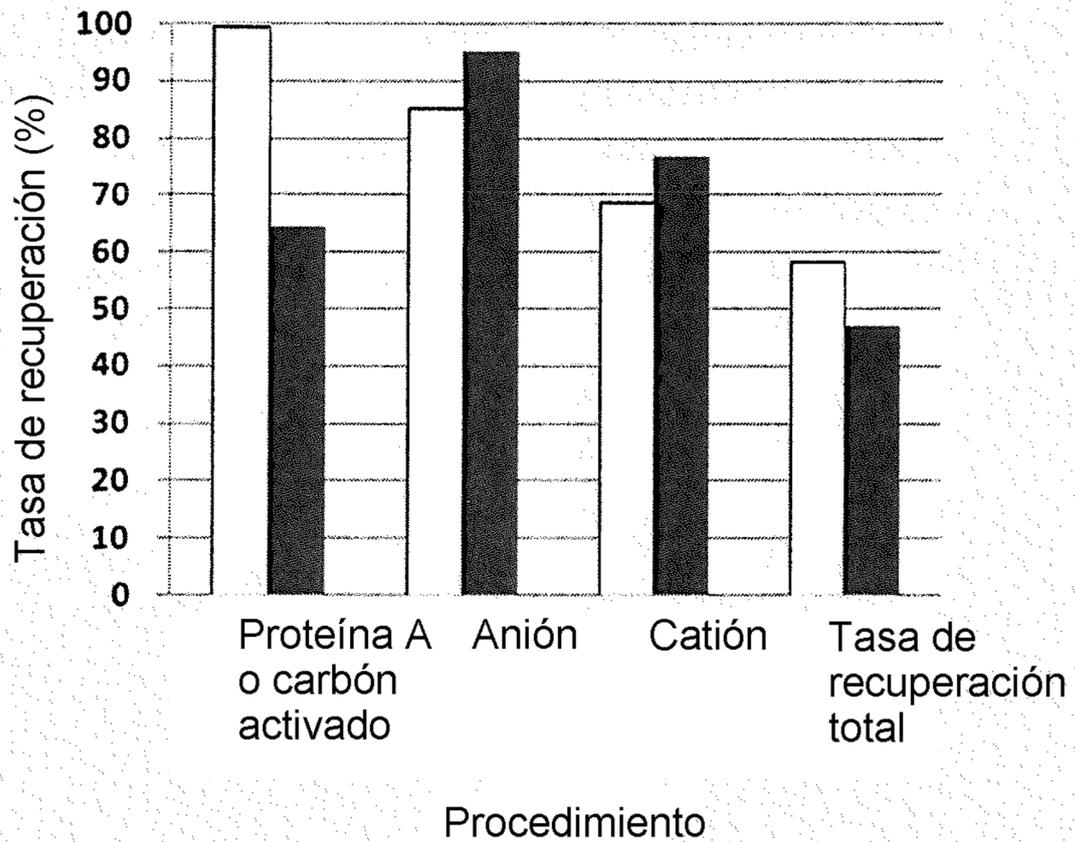


FIG. 8

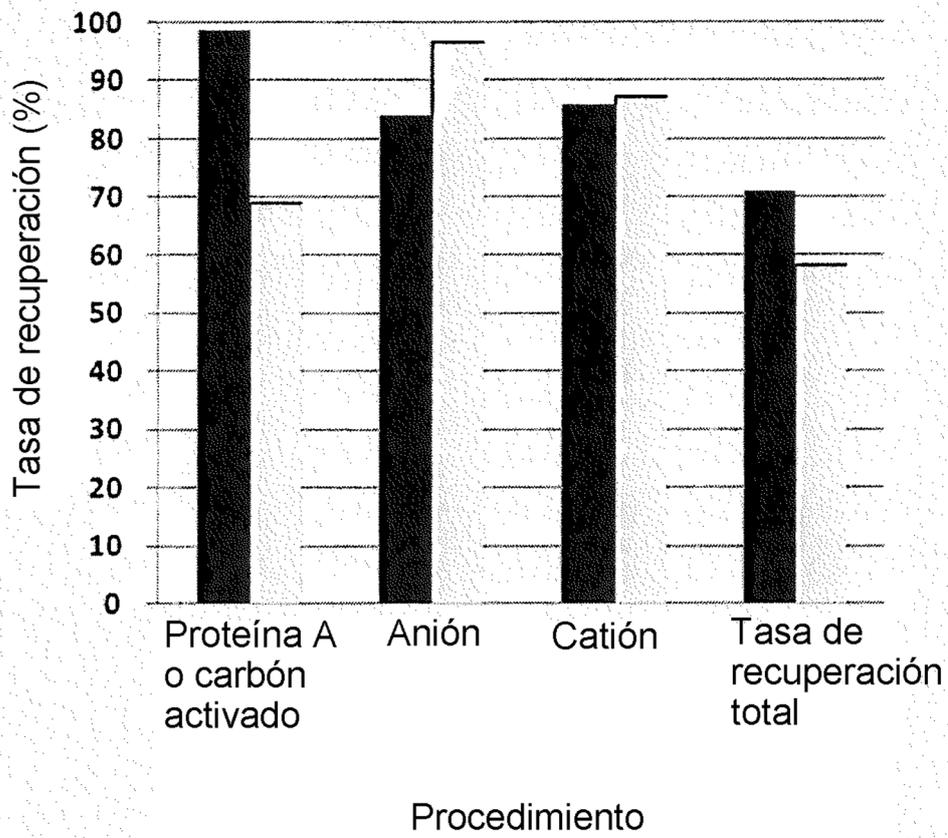


FIG. 9

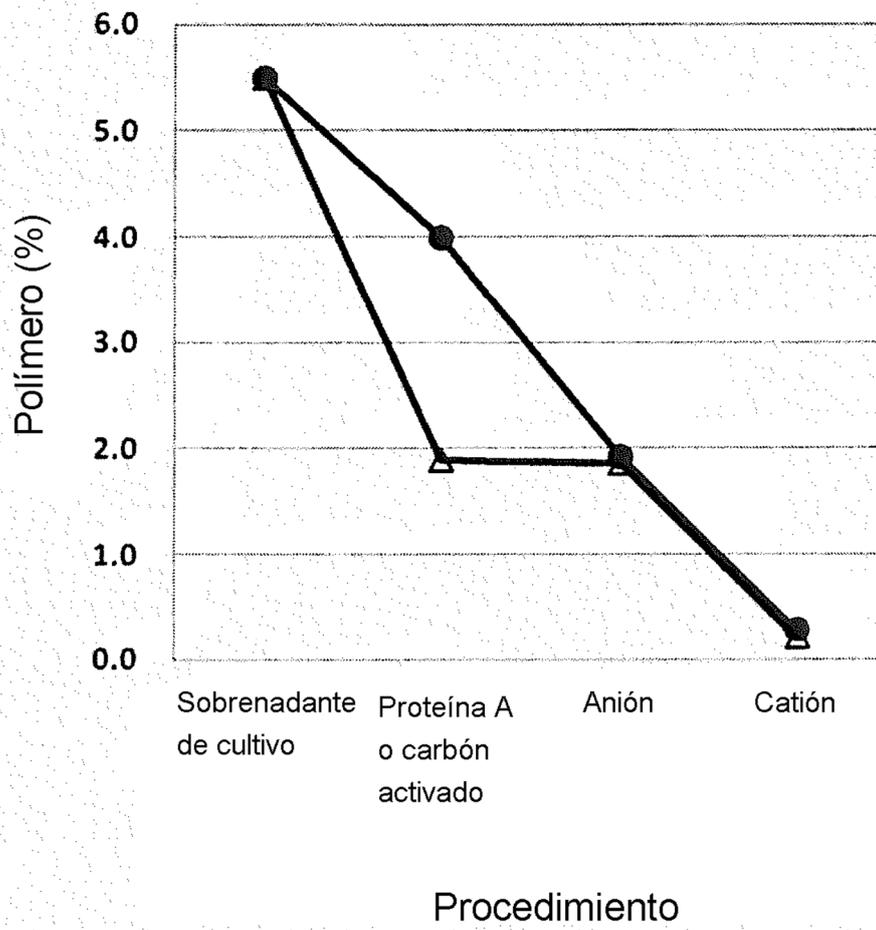


FIG. 10

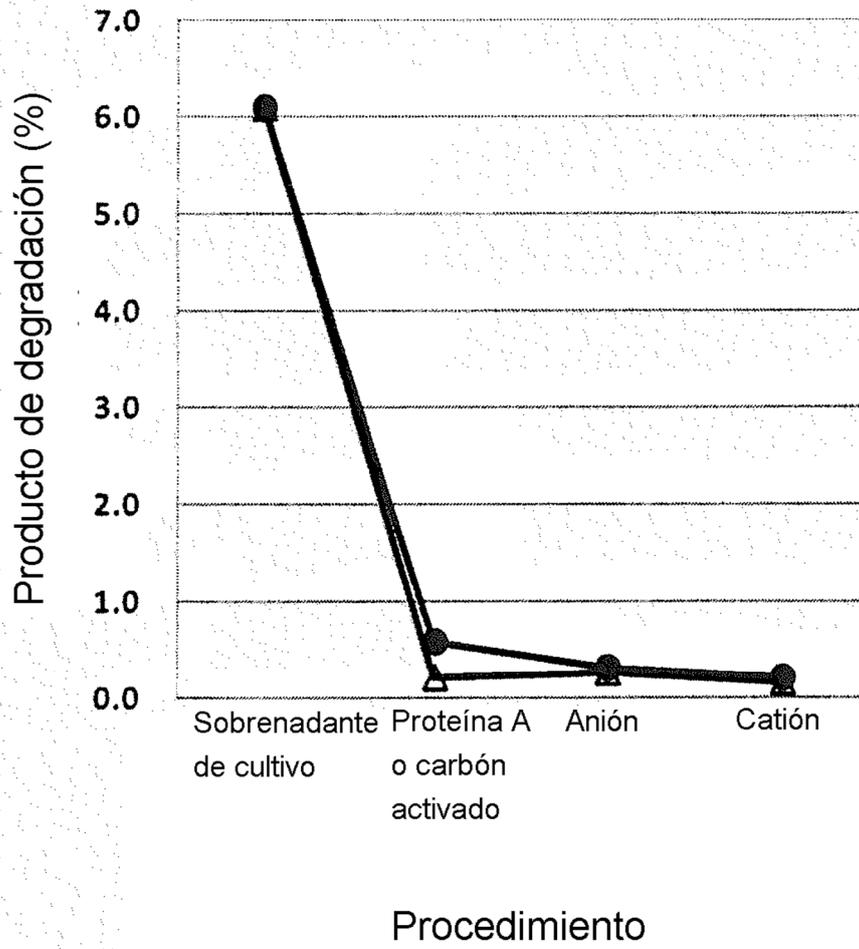


FIG. 11

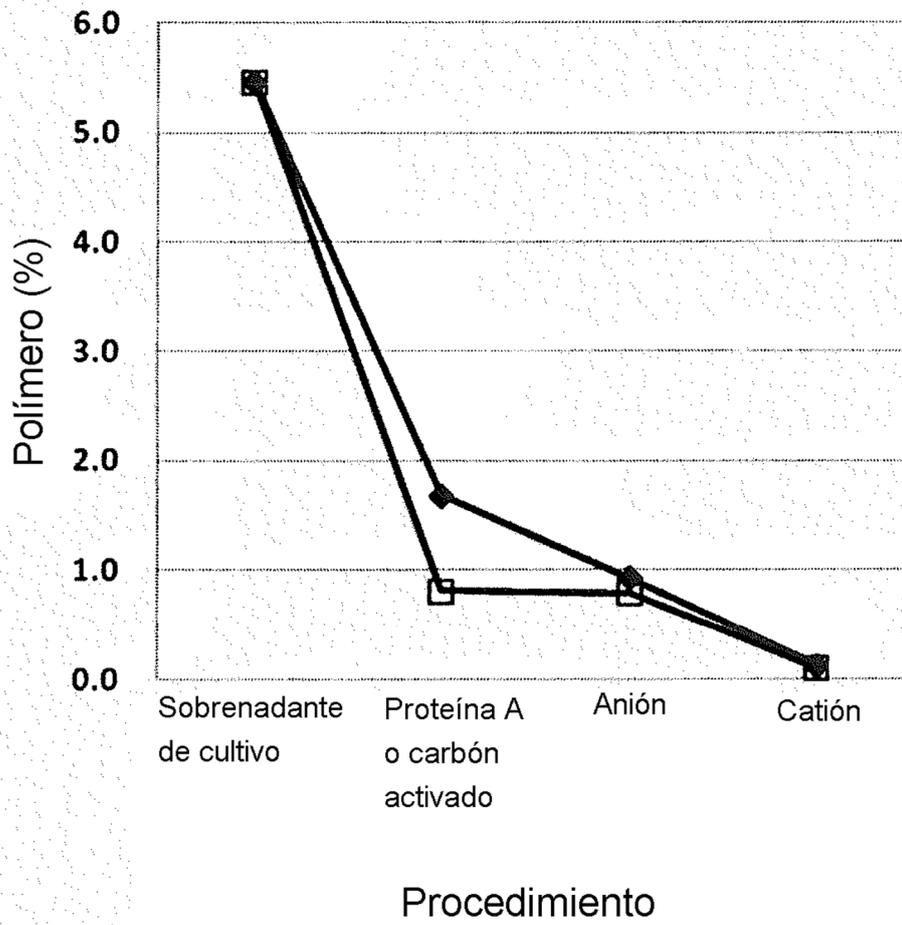


FIG. 12

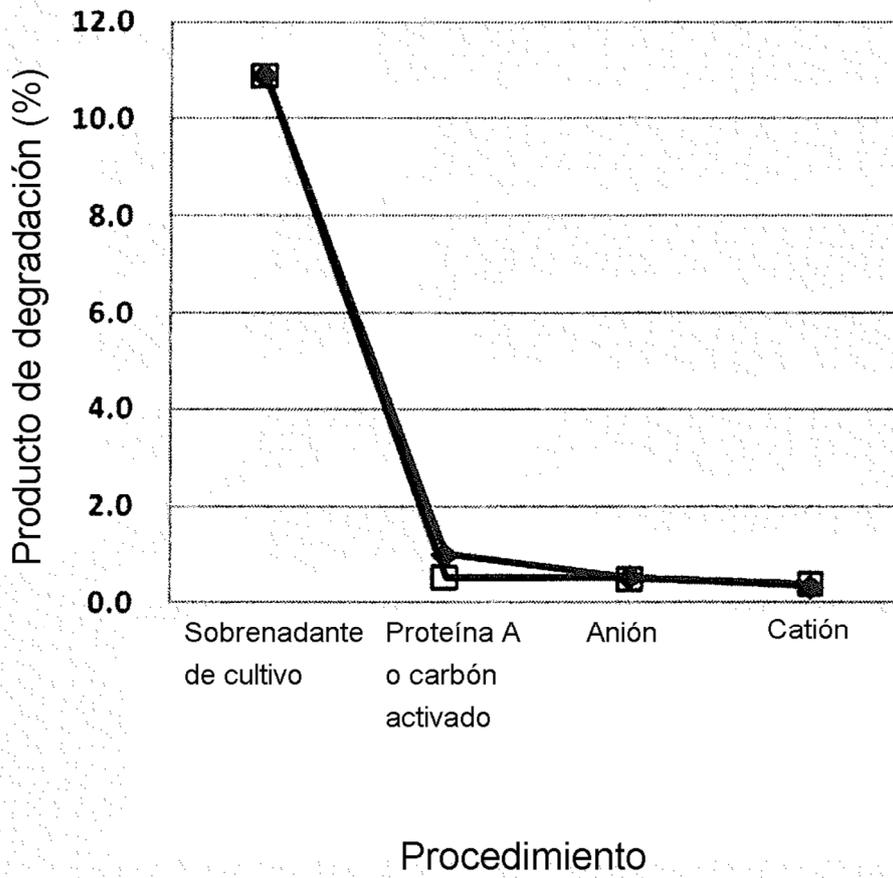


FIG. 13

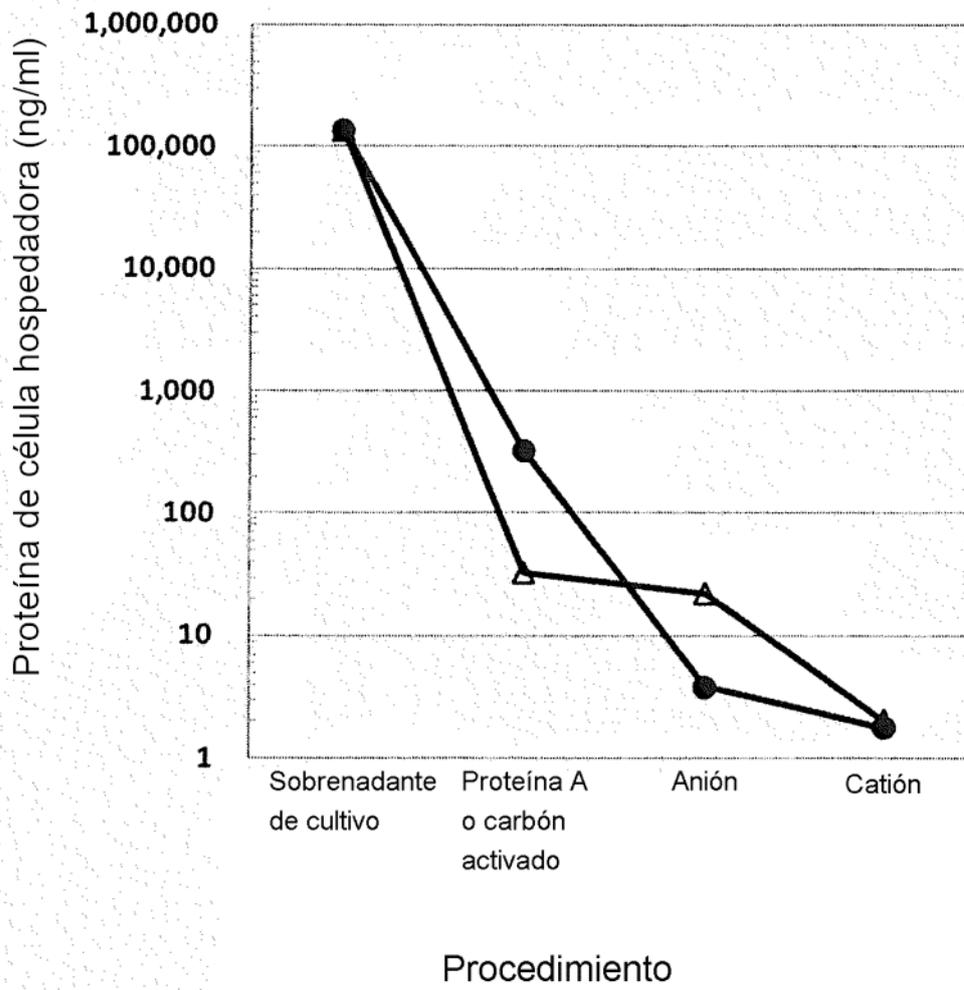


FIG. 14

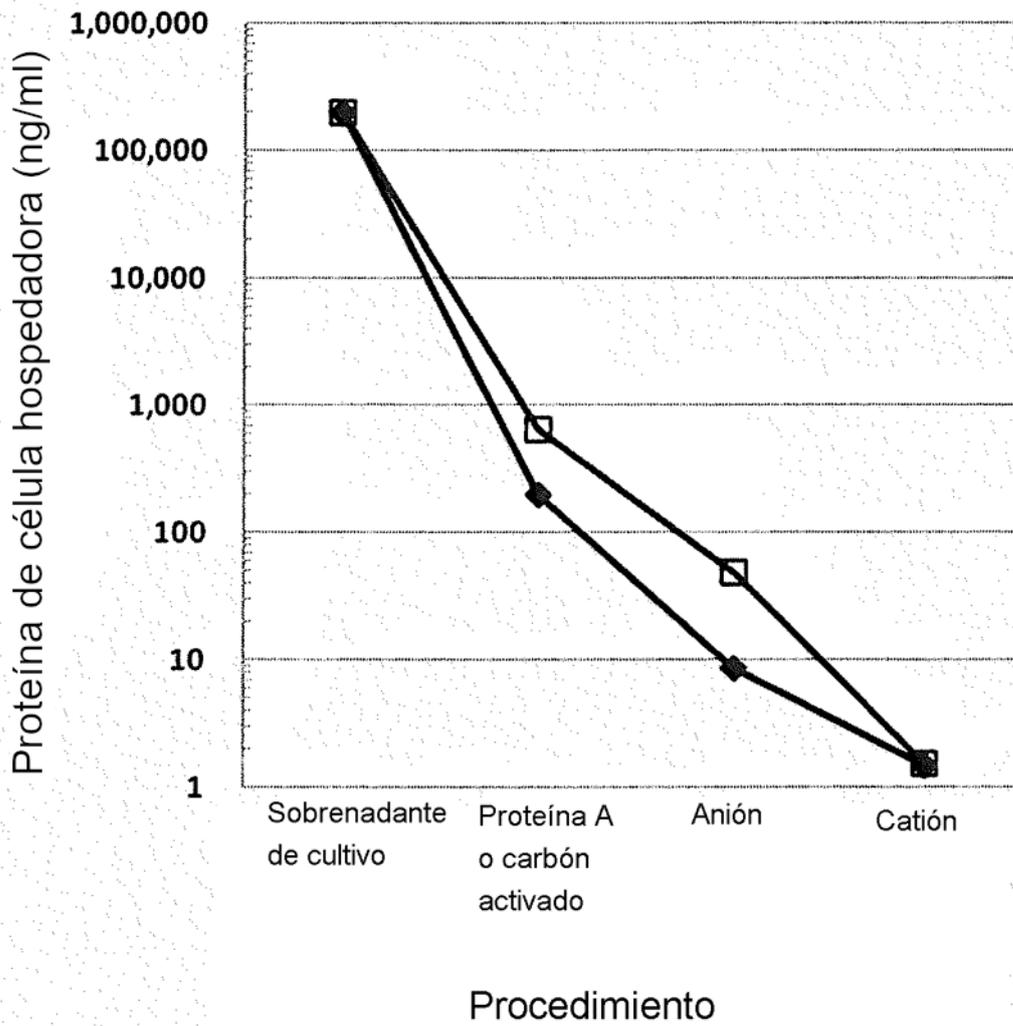


FIG. 15

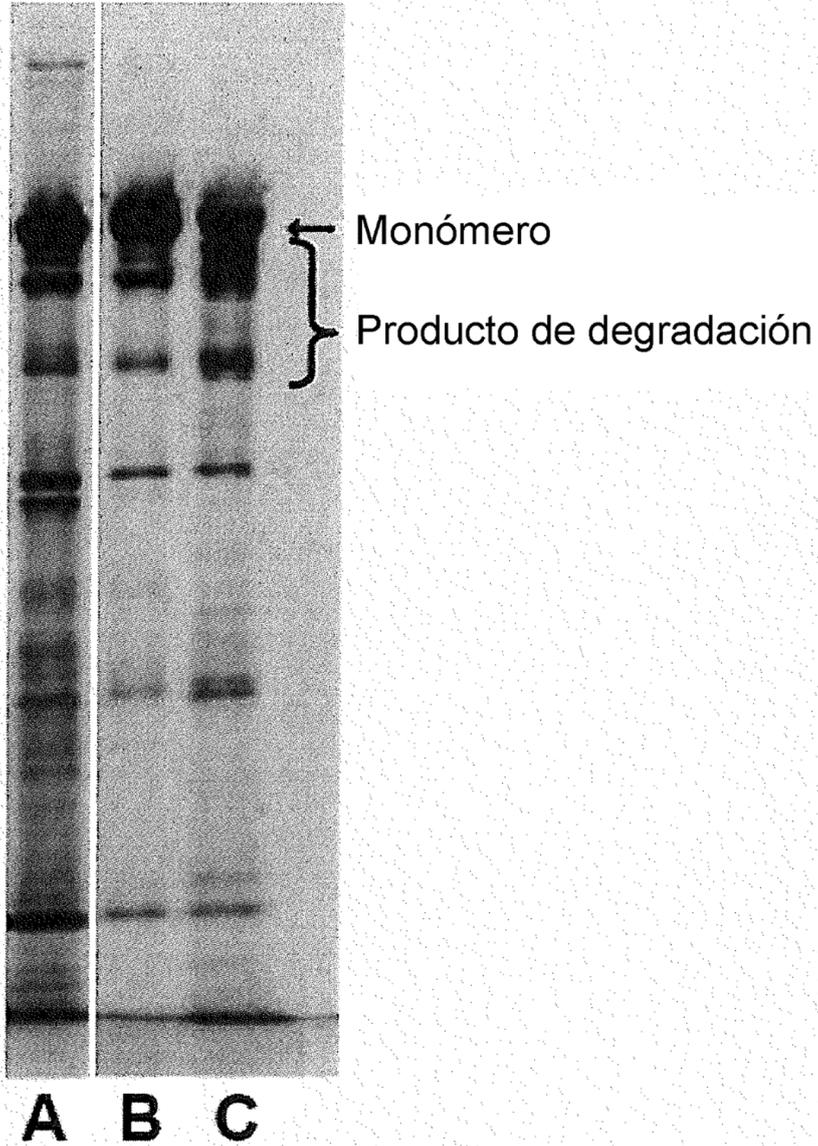


FIG. 16

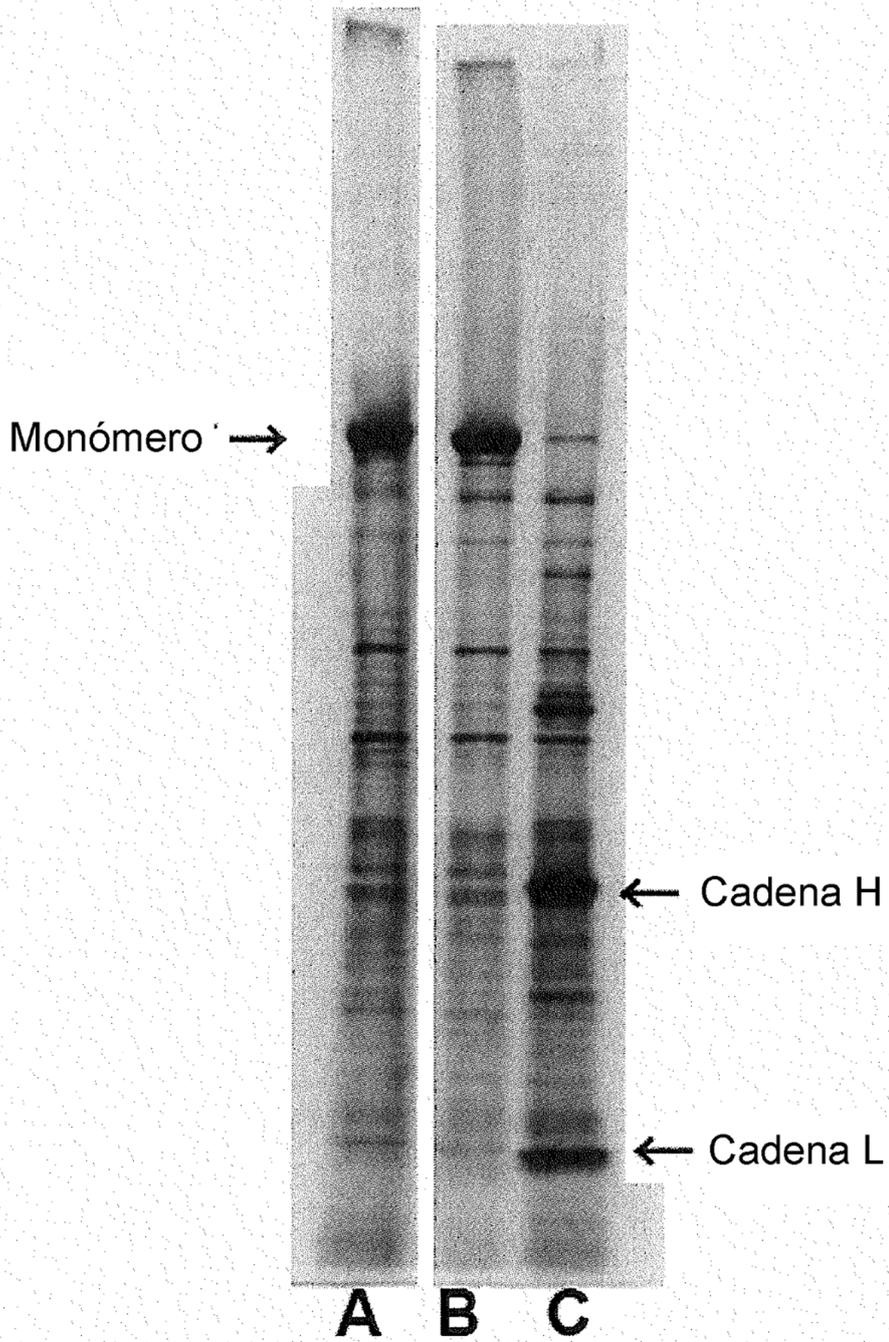


FIG. 17

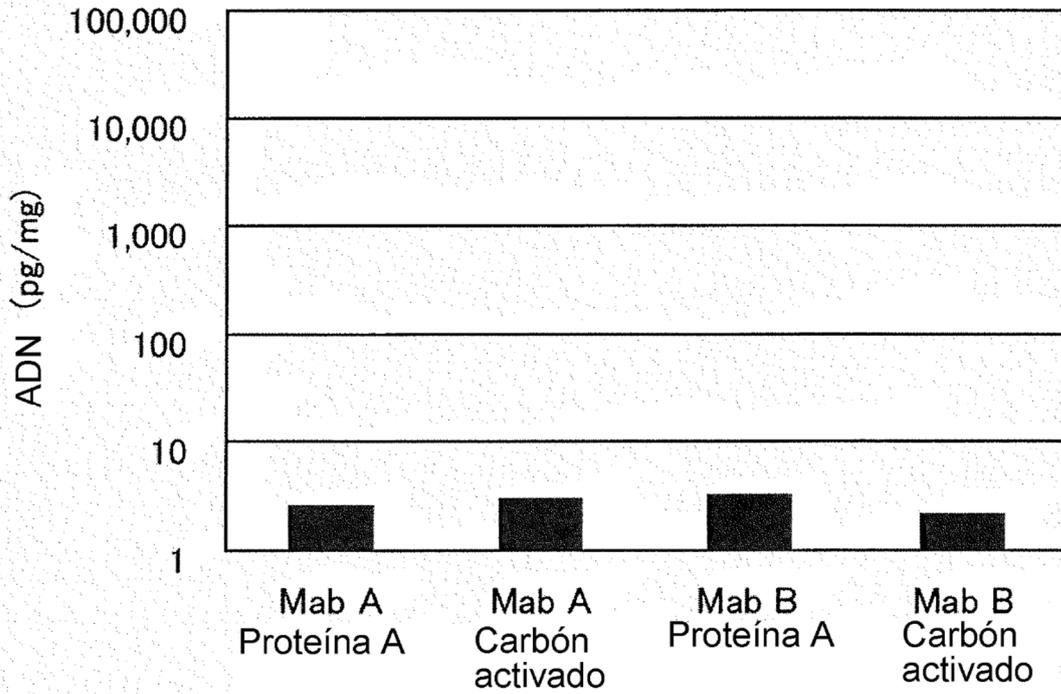


FIG. 18

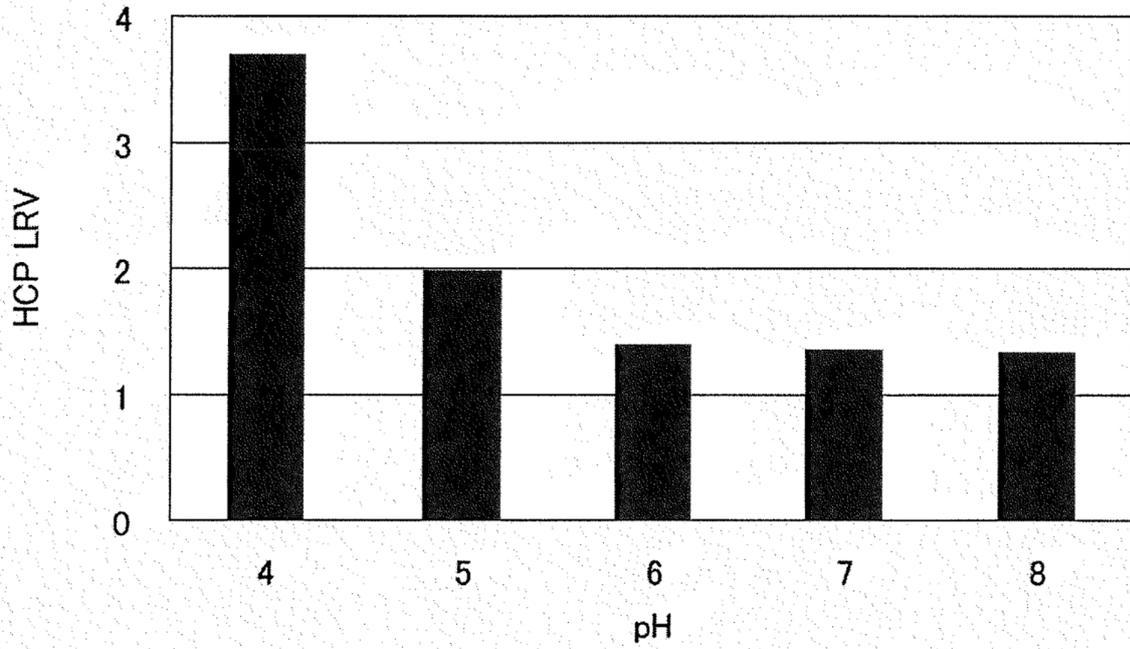


FIG. 19

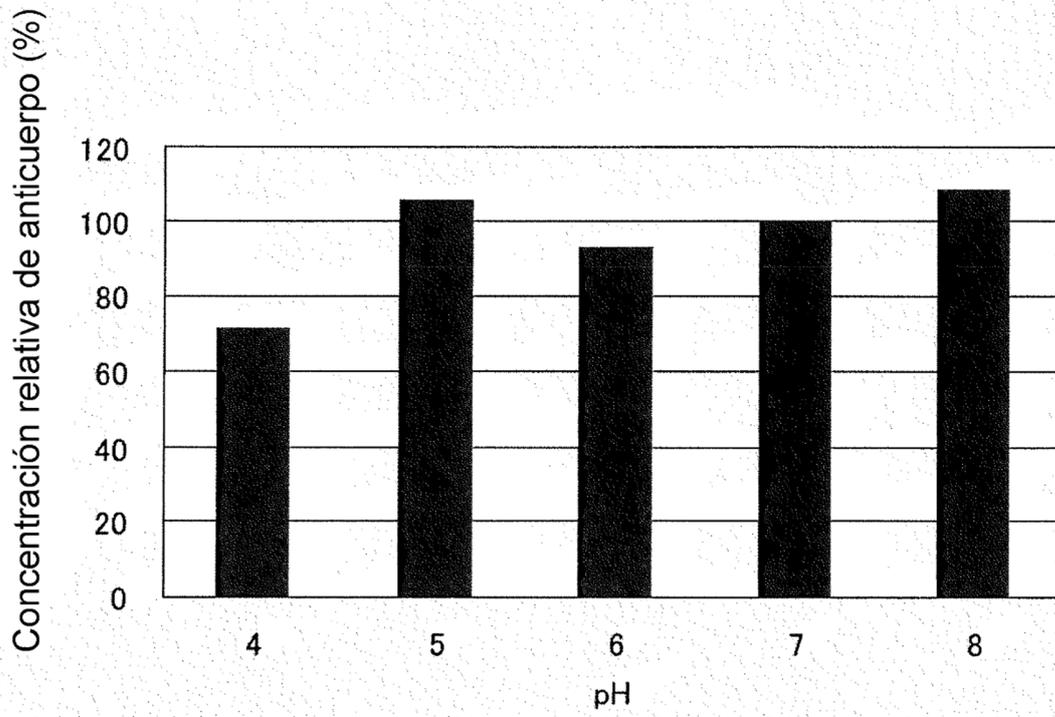


FIG. 20

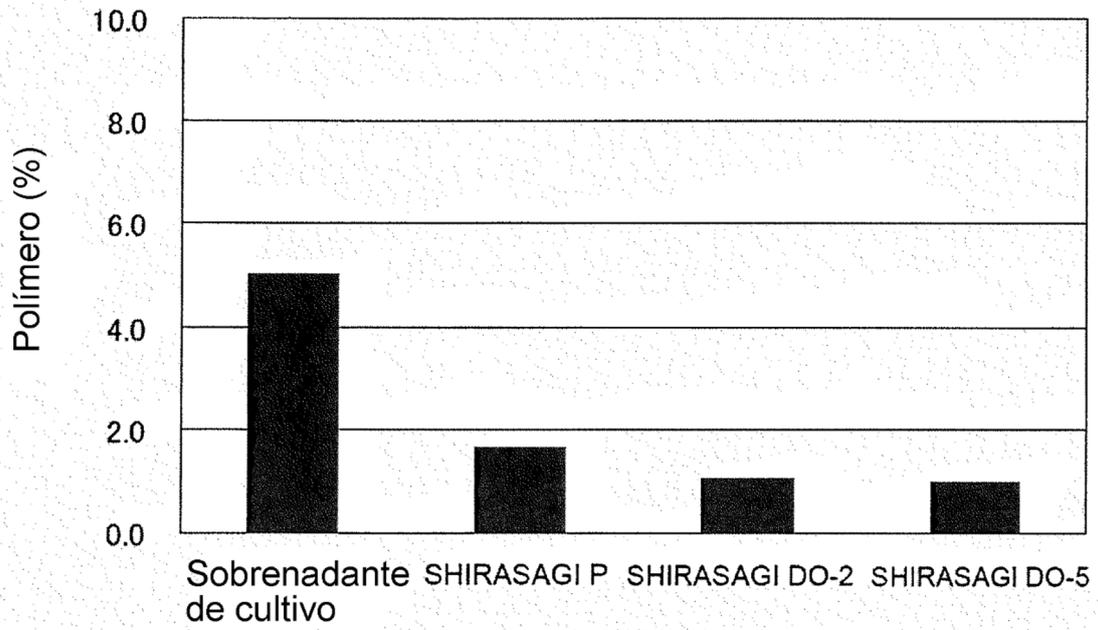


FIG. 21

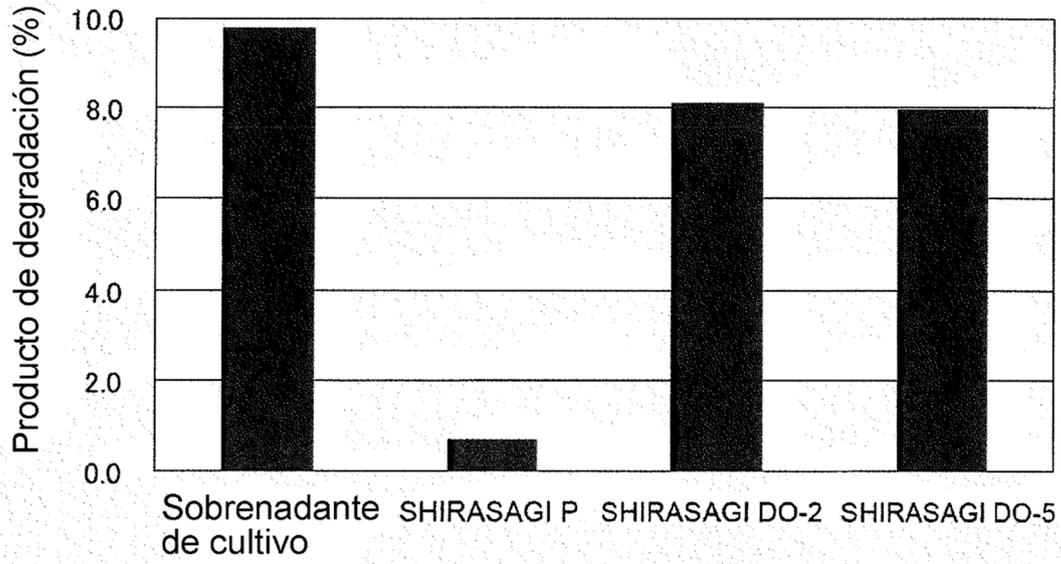


FIG. 22

