

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 628**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18	(2006.01)
C07K 1/22	(2006.01)
C07K 1/36	(2006.01)
B01D 15/36	(2006.01)
B01D 15/38	(2006.01)
B01D 15/42	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/US2012/031076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12764025 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2691411**

54 Título: **Sistema de tampón para purificación de proteína**

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201161468814 P

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

29.09.2020

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
251 Little Falls Drive
Wilmington, DE 19808, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 784 628 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

Sistema de tampón para purificación de proteína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la purificación de la proteína recombinante a partir de cultivo celular o caldo de fermentación utilizando una serie de operaciones de la unidad de cromatografía. Más específicamente, la invención se refiere a un sistema de tampón libre de cloruro de sodio utilizado en una serie de operaciones unitarias para la purificación de proteínas; donde un componente ácido y uno básico, junto con un tercer componente tampón de sal de sodio, se combinan en proporciones establecidas para proporcionar un control adecuado de pH y conductividad para una operación de cromatografía robusta.

10 **Antecedentes de la invención**

Los procesos de purificación ortogonal para la recuperación de proteínas recombinantes están bien establecidos en la industria bioprocesamiento y siguen evolucionando para mejorar el rendimiento, la eliminación de impurezas, el coste reducido de bienes, reducción del tiempo de desarrollo, escalabilidad, etc. En los últimos años, los enfoques de plataforma tienen maduró significativamente hasta donde los procesos de plantilla genéricos que requieren un esfuerzo de desarrollo mínimo pueden emplearse en la recuperación de una variedad de subclases de proteínas recombinantes, especialmente anticuerpos monoclonales. En este caso, el concepto central que subyace al desarrollo del proceso de la plataforma para los anticuerpos monoclonales y otras proteínas es la identificación e implementación de operaciones unitarias comunes que son aplicables a una amplia clase de moléculas objetivo, lo que lleva a un marco de pasos de purificación que podrían usarse para diseñar rápidamente procesos escalables y robustos. A medida que se desarrollan las condiciones de operación para la secuencia de cromatografía y los pasos de membrana/filtración, una consideración clave es la selección cuidadosa de los componentes del tampón que conducen a la robustez y al rendimiento mejorado del proceso. Sin un enfoque sistemático, el proceso de selección del tampón a través de la experimentación tradicional a escala de banco a menudo puede conducir a una gran cantidad de componentes que no están necesariamente integrados desde la operación de la unidad hasta la operación de la unidad y pueden ser engorrosos de implementar en la fabricación a gran escala. Para superar estos problemas y limitar la cantidad de componentes de tampón necesarios para un proceso integrado; proponemos aquí un sistema de tampón de dos componentes sin cloruro de sodio.

Sumario de la invención

30 En un aspecto, la presente invención está dirigida a un sistema de cromatografía que comprende: (i) un sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro para la purificación de una proteína recombinante; y (ii) una serie de unidades de cromatografía, en el que las unidades de cromatografía comprenden cromatografía de afinidad y una o más unidades de cromatografía adicionales elegidas entre: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de modo mixto,

en el que las unidades de cromatografía se operan en el modo de elución de unión o modo de flujo pasante,

35 en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprenden:

(a) un ácido orgánico;

(b) un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico de (a); y

(c) una base orgánica; y

40 en el que el sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio se usa en la serie de unidades de cromatografía.

En otro aspecto de la invención la presente invención está dirigida a un procedimiento para purificar una proteína recombinante a partir de una solución contaminada del mismo que comprende las etapas de (i) purificar la proteína en una serie de etapas de cromatografía usando un sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio, en el que los pasos de cromatografía comprenden cromatografía de afinidad y uno o más pasos de cromatografía adicionales elegidos entre: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de modo mixto, y en el que los pasos de cromatografía se operan en modo de elución de unión o modo de flujo pasante, y en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprende: (a) un ácido orgánico, (b) un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico de (a), y (c) una base orgánica; y en el que el sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio se usa en la serie de etapas de cromatografía, y (ii) recuperar la proteína purificada.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía de Proteína A que comprende: (a) equilibrar un Proteína

A inmovilizada sobre una fase sólida con un tampón de equilibrio de proteína A que comprende 55 mM Tris-Base, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la proteína A inmovilizada en la fase sólida; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de proteína A que comprende base Tris 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato sódico 300 mM, a aproximadamente pH 7,5; y (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de proteína A que comprende acetato de sodio 1,8 mM, ácido acético 28,2 mM, a aproximadamente pH 3,6, el procedimiento comprende además cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico, y en el que todos los tampones están hechos sin la adición de NaCl y en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprenden un ácido acético, un metal alcalino de la base conjugada del ácido acético y una Tris-Base.

Se divulga un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada del mismo mediante cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio aniónico con un tampón de equilibrio aniónico que comprende 55 mM Tris-Base, 45 mM de ácido acético, a aproximadamente pH 7,5; (b) aplicar la solución contaminada a la matriz de intercambio aniónico y recoger el primer flujo; y (c) aplicar un tampón de lavado de aniones que comprende Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato sódico 300 mM, a aproximadamente pH 7,5 a la matriz de intercambio aniónico y recoger el segundo flujo, en el que todos los tampones se hacen sin la adición de NaCl.

Se describe un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada del mismo mediante cromatografía de intercambio catiónico que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio catiónico con un tampón de equilibrio catiónico que comprende acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1, a aproximadamente pH 5,0; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la matriz de intercambio catiónico; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado catiónico que comprende acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0; y (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución catiónico que comprende acetato de sodio 175 mM, ácido acético 75 mM, a aproximadamente pH 5,0, en el que todos los tampones se hacen sin la adición de NaCl. La eliminación del cloruro de sodio del proceso asegura que el impacto corrosivo de las soluciones de cloruro de alta concentración en los equipos de procesamiento de acero inoxidable se gestione y evite por completo.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Diagrama de flujo del proceso corriente abajo para la plataforma de mAb. Se muestran los intervalos de fuerza iónica y pH claves para control de la cromatografía de proceso.

Fig. 2. Diagrama de la preparación ideal de tampón a gran escala de concentrados para minimización de materias primas y requerimientos de tanque.

Fig. 3. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH de sistema de tampón Tris-Base y ácido acético.

Fig. 4. Curvas calculadas y experimentales de pH, fuerza iónica y capacidad de tampón para el ácido cítrico y el sistema de tampón de Tris-Base.

Fig. 5. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH para sistema de tampón Tris-Base y ácido cítrico.

Figura 6. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH para sistema de tampón de fosfato de sodio y ácido acético.

Descripción detallada de la invención

Se ha de entender que esta invención no está limitada a determinados procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones, o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante. Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un polipéptido” incluye una combinación de dos o más polipéptidos, y similares.

“Aproximadamente”, como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, incluyendo $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, y $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos divulgados.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica para probar la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se

describen en el presente documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

Los beneficios de un sistema de tampón de dos componentes libre de cloruro de sodio se pueden realizar con una amplia variedad de componentes tampón adecuado para el procesamiento biológico, por ejemplo, ácido acético y Tris-Base. Sin embargo, este par específico de componentes, junto con la tercera base conjugada de sal de sodio (por ejemplo, acetato de sodio), ofrece ventajas para una plataforma de anticuerpos monoclonales que en particular incorpora cromatografía de intercambio aniónico y catiónico como etapas de pulido posteriores a la captura. En la cromatografía de proteína A, estas especies tampón son especialmente adecuadas; donde el equilibrio, la carga, el lavado se realiza normalmente a pH neutro y la elución requiere un cambio gradual a pH bajo. Aquí se puede diseñar una mezcla de ácido acético/tris para amortiguar a pH 7,0-8,0 para el equilibrio, una mezcla de ácido acético/acetato de sodio/Tris-Base para lavar a este mismo pH usando acetato de sodio de alta concentración para aumentar la fuerza iónica para un aclaramiento de impurezas relacionada con productos y procesos óptimos, y una mezcla de ácido acético/acetato de sodio para elución a pH bajo (3,6-3,8). Otra ventaja está simplemente relacionada con la adsorción electrostática mínima o el intercambio de especies de acetato y tampón tris durante la operación cromatográfica de intercambio iónico pertinente. Más específicamente, debido a que el ion Tris-Base tendrá una carga positiva a pH neutro (donde se realiza comúnmente la cromatografía de intercambio aniónico para un anticuerpo típico con un alto punto isoeléctrico), permanecerá en solución durante todo el paso de flujo AEX que proporciona tamponamiento adecuada en fase líquida a baja fuerza iónica. Por el contrario, el ion acetato tendrá una carga negativa y permanecerá como solución a través de la cromatografía de intercambio catiónico, evitando nuevamente el intercambio de coiones de tamponamiento y proporcionando un tamponamiento a un pH ácido (pH 5,0 por ejemplo). Este enfoque a concentraciones moderadas de tampón ayuda a mantener un pH constante a través de cambios de pasos, evitando transitorios de pH que pueden conducir a una pérdida en la eliminación de impurezas y el rendimiento de los pasos [1] [2] [3]. Otra ventaja clave está relacionada con los valores únicos de pKa de estas especies y las capacidades de tampón a valores de pH que son más relevantes para cada paso en el proceso de la plataforma (Figura 1). El pKa único del tampón de acetato, por ejemplo, permite una cantidad reducida de ácido y base fuertes que se necesitan para lograr un pH bajo o neutralización durante el paso de inactivación del virus, minimizando el aumento de la fuerza iónica que resulta de la adición. La minimización de la fuerza iónica durante este paso es crítica para el máximo rendimiento del siguiente paso de flujo de cromatografía de intercambio aniónico. La baja fuerza iónica en el producto de intercambio aniónico permite una alta capacidad de unión en el paso de cromatografía de intercambio catiónico, integrando completamente los cuatro pasos en el proceso (desde un punto de vista de selección de tampón) y evitando la necesidad de TFUF o dilución entre los pasos. Finalmente, la eliminación del cloruro de sodio del proceso asegura que el impacto corrosivo de las soluciones de cloruro de alta concentración en el equipo de procesamiento de acero inoxidable se gestione y evite por completo. La solución de cloruro de alta concentración, especialmente a niveles de pH ácidos (necesarios, por ejemplo, durante la cromatografía de intercambio catiónico) está asociada con la corrosión y se ha informado que es problemática para las instalaciones de fabricación. [4]

La presente invención se refiere específicamente a la utilización del sistema de tampón de ácido/base simplificada en el contexto de un proceso de plataforma en combinación con el componente tampón sal de sodio como un reemplazo para el cloruro de sodio, base de tris alta concentración, u otro componente para la modulación de fuerza iónica. Este enfoque conduce a un control de pH y conductividad más robusto en el rango de pH 3,4-7,7 y, a su vez, mejora el rendimiento de cada paso de cromatografía, en relación con un proceso más tradicional que incorpora una mayor cantidad de componentes de tampón.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Un polipéptido puede ser de origen natural (derivado de tejido), expresión recombinante o natural de preparaciones celulares procariotas o eucariotas, o producirse químicamente mediante procedimientos sintéticos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y a los polímeros de aminoácidos no naturales. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural. Los residuos no naturales están bien descritos en la literatura científica y de patentes; A continuación, se describen algunas composiciones no naturales ejemplares útiles como miméticos de residuos de aminoácidos naturales y directrices. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se pueden generar reemplazando, por ejemplo, D- o L-nafilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tieneilalanina; D- o L-1, -2,3-, o 4-pireneilalanina; D- o L-3-tieneilalanina; D- o L-(2-piridinil) -alanina; D- o L-(3-piridinil) -alanina; D- o L-(2-pirazinil) -alanina; D- o L-(4-isopropil) -fenilglicina; D-(trifluorometil) -fenilglicina; D-(trifluorometil) -fenilalanina; Dp-fluorofenilalanina; D- o Lp-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol (alquil) alaninas; y, D- o L-alquinilaminas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, isopentilo sustituido o no sustituido, o un aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo aromáticos.

“Péptido” como se usa en el presente documento incluye péptidos que son variaciones conservadoras de esos péptidos específicamente ejemplificados en el presente documento. “Variación conservadora” como se usa en el

presente documento denota el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de un residuo hidrófobo como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otra, o la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, glutámica por ácidos aspárticos o glutamina por asparagina, y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden sustituirse entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. La “variación conservadora” también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, siempre que los anticuerpos generados para el polipéptido sustituido también inmunoreaccionan con el polipéptido no sustituido. Dichas sustituciones conservadoras están dentro de la definición de las clases de los péptidos de la invención. “Catiónico”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier péptido que posee una carga neta positiva a pH 7,4. La actividad biológica de los péptidos se puede determinar mediante procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento.

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

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

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

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos

Una Letra	Tres Letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano

(continuación)

Una Letra	Tres Letras	Aminoácido
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína.

Hay que señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos están representadas en la presente memoria por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional de terminal amino al terminal carboxi.

5 En otra realización, el polipéptido es un polipéptido de unión a antígeno. En una realización, el polipéptido de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un receptor soluble, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv ligado a disulfuro o diacuerpo.

10 El término "polipéptido de unión a antígeno", como se usa aquí se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras construcciones de proteína que son capaces de unirse a un antígeno.

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

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

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

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

35 El término "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donante, que contribuye todas (o cualquier porción, pero en todos algunas formas de realización) de las secuencias de aminoácidos que codifica su regiones marco de cadena pesada y/o de cadena ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera para el primer compañero de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

40 Las "CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR de cadena pesada y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, o las tres CDR de cadena ligera (o ambas CDR de cadena pesada y ligera, si es apropiado). La estructura y el plegamiento de proteínas del anticuerpo puede significar que otros residuos se consideran parte de la región de unión al antígeno y una persona experta lo entendería. Véanse,

por ejemplo, Chothia et al., (1989) conformaciones de regiones hipervariables de inmunoglobulina; Nature 342, p 877-883.

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

La frase “dominio variable único de inmunoglobulina” se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H, V_{HH}, V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región V o un dominio diferentes. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o heteromultímero) con otras regiones variables diferentes o dominios variables donde las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión al antígeno por el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, donde el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un “anticuerpo de dominio” o “dAb” es lo mismo que un “dominio variable único de inmunoglobulina” que es capaz de unirse a un antígeno como se usa el término en este documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo único de otras especies tales como dAb de roedores (por ejemplo, como se describe en WO 00/29004), tiburón nodriza y V_{HH} de Camélidos (nanocuerpos). V_{HH} de Camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies como camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Dichos V_{HH} dominios pueden humanizarse de acuerdo con las técnicas estándar disponibles en la técnica, y dichos dominios todavía se consideran “anticuerpos de dominio” según la invención. Como se usa en este documento, “ V_H incluye dominios V_{HH} de camélidos. Los NARV son otro tipo de dominio variable único de inmunoglobulina que se identificaron en peces cartilagosos, incluido el tiburón nodriza. Estos dominios también se conocen como región variable del receptor de antígeno nuevo (abreviada comúnmente como V (NAR) o NARV). Para más detalles ver Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) y US20050043519A.

El término “epítipo de unión a dominio” se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región V o un dominio diferentes, esto puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina de ser humano, camélido o tiburón.

Como se usa en este documento, el término “sitio de unión a antígeno” se refiere a un sitio sobre una proteína que es capaz de unirse específicamente al antígeno, esto puede ser un solo dominio, por ejemplo, un dominio de unión a epítipo, o puede ser dominios $V_H N_L$ emparejados como se pueden encontrar en un anticuerpo estándar. Los dominios Fv de cadena sencilla (ScFv) pueden proporcionar sitios de unión a antígeno.

Los términos “mAbdAb” y “dAbmAb” se utilizan aquí para referirse a proteínas de unión a antígeno de la presente invención. Los dos términos se pueden utilizar indistintamente, y están destinados a tener el mismo significado como se usa en el presente documento.

Se divulga un sistema de tampón de múltiples componentes para la purificación de proteínas por una serie de etapas de cromatografía, donde los modos de cromatografía se seleccionan del grupo que consiste en cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio de cationes, y cromatografía de modo mixto, en la que los modos de cromatografía funcionan tanto en modo de eluato unido como en modo de flujo pasante, donde el sistema de tampón de múltiples componentes comprende un ácido orgánico, un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico y una base orgánica y en donde los modos de cromatografía se realizan usando tampones que se hacen sin la adición de NaCl.

En una realización, la cromatografía de afinidad se realiza usando un superantígeno. “Superantígeno” se refiere a ligandos genéricos que interactúan con miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas en un sitio que es distinto de los sitios de unión a ligando diana de estas proteínas. Las enterotoxinas estafilocócicas son ejemplos de superantígenos que interactúan con los receptores de células T. Los superantígenos que se unen a los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, la proteína G, que se une a la región constante de IgG (Bjorck and Kronvall, J. Immunol., 133:969 (1984)); Protein A which binds the IgG constant region and VH domains (Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97:822 (1966)); and Protein L which binds VL domains (Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)). En una realización, el superantígeno es la proteína A.

En muchos casos, puede ser más ventajoso en realidad seleccionar condiciones en las que su proteína fluirá a través mientras que los contaminantes se unirán. Este modo de enlace a menudo se denomina “modo de flujo

pasante". En la presente solicitud, la solución que fluye a través durante la cromatografía se denomina "flujo pasante".

5 Cuando se usa aquí, el término "proteína A" abarca la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, Proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y variantes del mismo que retienen la capacidad de unir proteínas que tienen una región C_H2/C_H3. La proteína A se puede comprar comercialmente de Repligen, Pharmacia y Fermatech.

10 El superantígeno se inmoviliza sobre una fase sólida. Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el superantígeno. La fase sólida de interés en el presente documento es generalmente una que comprende una superficie de vidrio, sílice, agarosa o poliestireno. La fase sólida puede ser una columna de purificación o una fase discontinua de partículas discretas. En realizaciones preferidas, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En ciertas realizaciones, la fase sólida está recubierta con un reactivo (tal como glicerol) que está destinado a prevenir la adherencia no específica de contaminantes a la fase sólida.

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

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

El "tampón de carga" es la que se utiliza para cargar la mezcla de la proteína y contaminante (s) sobre la matriz de cromatografía. Los tamponadores de equilibrio y carga pueden ser los mismos.

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

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

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

25 En una realización, la base orgánica incluye, pero no se limita a, el grupo que consiste en Tris-Base, arginina, Bis-Tris, Bis-Tris-propano, bicina N,N-bis (glicina(2-hidroxietil)), HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinaetanosulfónico), TAPS (3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico) y tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina).

30 En una realización, la base conjugada del ácido orgánico es la sal de potasio, sodio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico. En una realización, el ácido orgánico es ácido acético y la base conjugada del ácido acético es la sal de sodio.

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

35 En una realización, la secuencia de pasos cromatográficos comprende cromatografía de proteína A y cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante. En una realización, la secuencia de etapas cromatográficas comprende cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante y cromatografía de intercambio catiónico.

40 En una realización, la secuencia de pasos cromatográficos comprende cromatografía de proteína A llevada a cabo en presencia de alrededor de Tris-Base 55 mM, sobre el ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5.

En una realización, la secuencia de pasos cromatográficos comprende cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante realizada en presencia de aproximadamente Tris-Base 55 mM, sobre ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5.

45 En una realización, la secuencia de pasos cromatográficos comprende cromatografía de intercambio catiónico realizada en presencia de acetato de sodio aproximadamente 25 mM, de ácido acético aproximadamente 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0.

50 En un aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía de Proteína A que comprende: (a) equilibrar un Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida con una proteína A de equilibrado tampón que comprende aproximadamente Tris-Base 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la proteína A inmovilizada en la fase sólida; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de proteína A que comprende Tris-Base aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM, acetato sódico 300 mM, a aproximadamente pH 7,5; y (d) recuperar la proteína de la fase

5 sólida con un tampón de elución de proteína A que comprende acetato de sodio aproximadamente 1,8 mM, ácido acético aproximadamente 28,2 mM, a aproximadamente pH 3,6, el procedimiento comprende además cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico, y en donde todos los tampones están hechos sin la adición de NaCl y en donde los componentes del sistema de tampones multicomponente sin cloruro de sodio comprenden un ácido acético, un metal alcalino de la base conjugada del ácido acético y una Tris-Base.

En una realización, el procedimiento comprende además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes del paso (d): eliminación de contaminantes por lavado de la fase sólida con un segundo lavado de proteína tampón que comprende Tris-Base aproximadamente 55 mM, Ácido acético aproximadamente 45 mM, a aproximadamente pH 7,5, en el que el segundo tampón de lavado de proteína A se prepara sin la adición de NaCl.

10 En una realización, el procedimiento comprende además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) titulación de la solución que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético aproximadamente 30 mM, sobre HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con aproximadamente Tris 1 M.

15 En una realización, el procedimiento comprende además la filtración de la solución producida en la etapa (g).

Se divulga un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada del mismo mediante cromatografía de intercambio aniónico de flujo pasante que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio aniónico con un tampón de equilibrio aniónico que comprende aproximadamente el 55 de base mM tris, sobre ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; (b) aplicar la solución contaminada a la matriz de intercambio aniónico y recoger el primer flujo; y (c) aplicar un tampón de lavado de aniones que comprende Tris-Base 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM, acetato sódico aproximadamente 300 mM, a aproximadamente pH 7,5 a la matriz de intercambio aniónico y recoger el segundo flujo, en el que todos los tampones se hacen sin la adición de NaCl.

La solución contaminada puede ser la solución producida por la etapa (g) o la solución filtrada.

25 El primer paso de flujo y el segundo flujo pasante se pueden combinar en una única solución de flujo pasante combinado.

El pH del primer flujo pasante, el segundo flujo pasante, y la solución de flujo pasante combinado único puede ser ajustado a aproximadamente pH 5,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM.

30 Se describe un procedimiento para purificar una proteína a partir de una solución contaminada del mismo mediante cromatografía de intercambio catiónico que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio catiónico con un tampón de equilibrio catiónico que comprende acetato de sodio aproximadamente 25 mM, sobre el ácido acético 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la matriz de intercambio catiónico; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado catiónico que comprende aproximadamente 25 mM de acetato de sodio, aproximadamente 12,1 mM de ácido acético, a aproximadamente pH 5,0; y (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución catiónico que comprende acetato de sodio 175 mM, ácido acético 75 mM, a aproximadamente pH 5,0, en el que todos los tampones se hacen sin la adición de NaCl.

La solución contaminada se puede seleccionar del primer flujo pasante, el segundo flujo pasante, la solución única de flujo pasante combinado, y el flujo pasante de pH ajustado.

Ejemplo 1

40 Se ha evaluado un número de componentes potenciales de tamponamiento que se podrían implementar en un sistema de tampón de dos componentes, junto con un tercer componente para la modulación de la fuerza iónica (excluyendo deliberadamente de cloruro de sodio) a través de un proceso de plataforma para la purificación de anticuerpos. La Tabla 2 enumera estos componentes que generalmente se consideran compatibles con bioprocesos. En estos experimentos, como se muestra en la Figura 2, se usó un sistema de cromatografía líquida con capacidades de suministro de gradiente, para mezclar soluciones tampón concentradas y medir el pH y la conductividad en varias relaciones. Las Figuras 3, 4, 5, 6 presentan resultados de muestras para ácido acético/Tris-Base, ácido cítrico/Tris-Base, ácido acético/fosfato de sodio y ácido cítrico/fosfato de sodio, respectivamente. En estas figuras, los puntos de datos de círculo abierto representan valores de pH medidos experimentalmente en función de la molaridad del tampón, mientras que las líneas continuas y discontinuas representan el pH calculado, la conductividad (en general proporcional a la conductividad de la solución) y los valores de capacidad del tampón determinados a través de la solución del modelo matemático de Davies bien establecido [5] para predecir el comportamiento de los iones en soluciones acuosas. Estas curvas permiten la determinación de las relaciones de tampón requeridas necesarias para producir una mezcla de especies iónicas que resultan en un pH específico y un nivel de fuerza iónica, y por lo tanto se convierten en una herramienta para evaluar la idoneidad de un tampón para un paso de cromatografía específico.

Tabla 2. Tampones considerados para estudios de mezcla de dos componentes.

Componente de tampón	Carga, completamente desprotonada	pKa1	pKa2	pKa3
Ácido Acético	-1	4,757	-	-
Ácido Cítrico	-3	3,128	4,761	6,396
Tris	0	8,075	-	-
Ácido Fosfórico	-3	2,148	7,199	12,35
Glicina	-2	2,35	9,778	-
Arginina	-1	1,823	8,991	12,48
Bis-Tris	0	6,46	-	-
Bis-Tris Propano	0	6,80	9,0	-
Ácido Málico	-2	3,459	5,097	-
HEPES	-1	~3	7,48	-

Por ejemplo, la Figura 3 muestra los resultados para una mezcla de ácido acético y Tris-Base, lo que demuestra que, con el fin de amortiguar, por ejemplo, a un pH de 7,5, una composición de Tris-Base 55 mM, se necesita ácido acético 45 mM y proporciona una capacidad de 19 mM. En general, los tamponadores se consideran tamponadores "adecuados" cuando la capacidad de tamponamiento se aproxima a 20 mM. Otras combinaciones de los diversos componentes mostrados en la Tabla 2 pueden evaluarse de esta manera y luego probarse en experimentos cromatográficos.

Se aplicó Este enfoque para determinar aún más la composición de ácido acético y Tris-Base que sería necesario para cumplir con los intervalos de pH y conductividad deseada para el proceso de plataforma global se muestra en la Figura 1. Un intervalo de valores de pH que se necesita específicamente para cada operación de la unidad de cromatografía en la plataforma varía de 3,6 a 7,5 unidades de pH, junto con un rango de niveles de conductividad de bajo a alto. Este último requisito (control de conductividad) se puede lograr con varios componentes. En este ejemplo, el acetato de sodio se seleccionó como la base conjugada del ácido acético usado para aumentar la fuerza iónica del tampón, donde el ion sodio proporciona un aumento directo en la fuerza iónica. La Tabla 3 resume las composiciones de tampón finales de este sistema de tampón de dos componentes para usar en experimentos de purificación. En esta tabla, observe el uso de acetato de sodio de alta concentración en los pasos de elución de cromatografía de intercambio catiónico y lavado de proteína A y la ausencia de cloruro de sodio.

Tabla 3. Sistema de tampón de ácido acético, acetato de sodio y Tris-Base y otras soluciones utilizadas en cada paso de la Plataforma de anticuerpos

Cromatografía Proteína A	
Equilibrio	Tris-Base 55 mM, Ácido acético 45 mM, pH 7,5 ± 0,2
Carga	Fluido de cultivo celular clarificado
Lavado 1	Tris-Base 55 mM, Ácido acético 45 mM, Acetato de sodio 300 mM, pH 7,5 ± 0,2
Lavado 2	Tris-Base 55 mM, Ácido acético 45 mM, pH 7,5 ± 0,2
Elución	Acetato de sodio 1,8 mM, Ácido acético 28,2 mM, pH 3,6 ± 0,1
Depuración	Ácido acético 300 mM, pH 2,6 ± 0,2
Limpieza	Hidróxido de sodio 0,1 M
Almacenamiento	Alcohol Bencílico al 2 % o Etanol al 18% (u otros)

(continuación)

Inactivación de bajo pH	
Tampón de ajuste de bajo pH	Elulato de Proteína A a pH 3,5 con Ácido acético 30 mM, HCl 100 mM
Inactivación de retención	Retención \geq 30 minutos no debe exceder 60 minutos
Ajuste de pH Post-Retención	Producto tratado con bajo pH, pH ajustado a pH 7,5 con Tris-Base 1 M
Cromatografía de intercambio aniónico	
Pre-Equilibrio	Agua para inyección (WFI)
Equilibrio	Tris-Base 55 mM, Ácido acético 45 mM, pH 7,5 \pm 0,2
Load	pH Ajustado, producto tratado con bajo pH
Lavado 1	Tris-Base 55 mM, Ácido acético 45 mM, pH 7,5 \pm 0,2
Cromatografía Proteína A	
Limpieza	Hidróxido de sodio 1,0 M
Almacenamiento	Hidróxido de sodio 0,1 M
Cromatografía de intercambio catiónico	
Equilibrio	Acetato de sodio 25 mM, Ácido acético 12,1 mM, pH 5,0 \pm 0,2
Carga	pH 5,0 \pm 0,10 producto de intercambio aniónico ajustado;
Lavado 1	Acetato de sodio 25 mM, Ácido acético 12,1 mM, pH 5,0 \pm 0,2
Elución	Acetato de sodio 175 mM, ácido acético 75 mM, pH 5,0 \pm 0,2
Limpieza	Hidróxido de sodio 1,0 M
Almacenamiento	Hidróxido de sodio 0,1 M

Ejemplo 2

5 Todos los procedimientos cromatográficos se llevaron a cabo utilizando un sistema AKTA Explorador 100 de GE Healthcare (Piscataway, NJ, EE.UU.). Los medios de cromatografía MabSelect SuRe Protein A y CaptoQ se obtienen de GE Healthcare (Piscataway, NJ, EE. UU.). La resina de intercambio catiónico GigaCapS 650M se obtiene de Tosoh Bioscience (Montgomeryville, PA, EE. UU.). Los medios de cromatografía se empaquetan a una altura del lecho de 25 cm, de acuerdo con la recomendación del fabricante, en columnas Vantage de 1,1 cm de diámetro obtenidas de Millipore Corporation (Bedford, MA, EE. UU.). Los anticuerpos monoclonales IgG utilizados para este trabajo se expresan de forma recombinante utilizando cultivo de células de mamífero en el sitio

10 GlaxoSmithKline Upper Merion (King of Prussia, PA, EE. UU.). Todos los productos químicos se obtienen de JT Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.) o Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.) y son de grado USP.

Cromatografía de proteína A

15 La purificación de anticuerpos monoclonales por cromatografía de afinidad de proteína A utilizando MabSelect SuRe se lleva a cabo de acuerdo con la Tabla 2. Primero, la columna se equilibra con Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, pH 7,5. El caldo de cultivo celular de mamífero clarificado se aplica luego a la columna hasta que se haya aplicado suficiente masa de carga a la columna. La columna se lava luego con Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato sódico 300 mM, pH 7,5. Antes de la elución, la columna se vuelve a equilibrar con Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, pH 7,5. La columna se eluye luego gradualmente con acetato de sodio 1,8 mM, ácido acético 28,2 mM, pH 3,6.

20 Tratamiento de pH bajo para la inactivación de virus

El eluato de la proteína A de la etapa anterior se ajusta a pH 3,5 con 30 mM de ácido acético, HCl 100 mM. El material con bajo pH ajustado se mantiene durante 30 a 60 minutos y luego se neutraliza a pH 7,5 con Tris-Base 1 M. El grupo neutralizado se filtra luego en preparación para los pasos de purificación posteriores.

Cromatografía de flujo de intercambio aniónico

- 5 La purificación adicional se logra equilibrando la columna de la CaptoQ con Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM de, pH 7,5 después de un enjuague pre-equilibrado con WFI (agua para inyección). Tenga en cuenta que el mismo tampón de equilibrio utilizado para el equilibrio de la proteína A se reutiliza en este paso, ofreciendo la ventaja de minimizar las soluciones de tampón que deben prepararse. El conjunto neutralizado se aplica luego a la columna donde fluyó la proteína de interés y se recoge mientras los contaminantes permanecen unidos a la columna.
- 10 Después de la aplicación de proteína, la columna se lava con un tampón de equilibrio adecuado de modo que la proteína restante se lava de la columna y se puede recoger.

Cromatografía de intercambio catiónico

- 15 La proteína recogida de la etapa de flujo de intercambio aniónico se titula a pH 5,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM. Nuevamente, tenga en cuenta la reutilización de la solución de tratamiento de pH bajo para el ajuste del pH en este paso. La columna GigaCapS 650M se equilibra con acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1 mM, pH 5,0. La carga titulada se aplica luego a la columna hasta que se alcanza la masa de carga deseada. La columna se vuelve a equilibrar con acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1 mM, pH 5,0. A continuación, la columna se eluye por etapas aplicando a la columna acetato de sodio 175 mM, ácido acético 75 mM, pH 5,0. El efluente de la columna se recoge y retiene para su posterior procesamiento.

20 **Referencias**

1. Ghose, S.; McNerney, T. M. Hubbard, B. pH transitions in ion-exchange systems: Role in the development of a cation exchange process for a recombinant protein. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 530-537.
2. Soto Perez, J. and Frey, D. D. Behavior of the Inadvertent pH Transient Formed by a Salt Gradient in the Ion-Exchange Chromatography of Proteins, *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 902-910
- 25 3. Pabst, T.M., Carta, G. pH transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups. (2007) *Journal of Chromatography A*, 1142, pp. 19-31.
4. Zhou, J. X., et al. pH-conductivity hybrid gradient cation-exchange chromatography for process-scale monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 1175 (2007) 69-80
- 30 5. Butler, J. N., *Ionic Equilibrium: Solubility and pH Calculations*. John Wiley and Sons (19998).

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de cromatografía que comprende: (i) un sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio para la purificación de una proteína recombinante; y (ii) una serie de unidades de cromatografía, en el que las unidades de cromatografía comprenden cromatografía de afinidad y una o más unidades de cromatografía adicionales elegidas entre: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de modo mixto,
- 5 en el que las unidades de cromatografía son operadas en modo de flujo pasante o modo de eluato unido en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprenden:
- (a) un ácido orgánico;
- 10 (b) un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico de (a); y
- (c) una base orgánica; y
- en el que el sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio es usada en la serie de unidades de cromatografía.
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que la cromatografía de afinidad es realizado usando un superantígeno inmovilizado en una fase sólida, y opcionalmente en el que el superantígeno es seleccionado del grupo que consiste en la proteína A, la proteína G y la proteína L.
- 15 3. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en el que el sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprende una solución tampón de equilibrio, una solución tampón de lavado y/o una solución tampón de elución.
- 20 4. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (a) el ácido orgánico se selecciona de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, glicina, glicilclicina, ácido succínico, TES (2-{ácido[tris(hidroximetil)metil]amino}etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)) y MES (2-(N-morfolino)ácido etanosulfónico); y/o
- 25 (b) la base orgánica se selecciona de Tris-Base, Bis-Tris, Bis-Tris-Propano, Bicina (N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina), HEPES (4-2-hidroxietyl-1-ácido piperazina-metanosulfónico), TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico) y tricina(N-tris(hidroximetil)metilglicina); y/o
- (c) la base conjugada del ácido orgánico es la sal de sodio, potasio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico.
- 30 5. El sistema de cualquier reivindicación precedente en el que:
- (a) el ácido orgánico es ácido acético; y/o
- (b) el ácido orgánico es ácido acético y la base conjugada del ácido acético es la sal de sodio; y/o
- (c) la base orgánica es Tris-Base.
6. El sistema de cualquier reivindicación precedente en el que la proteína recombinante es:
- 35 (a) una proteína de unión a antígeno; y/o
- (b) un anticuerpo de la clase IgG; y/o
- (c) un dominio variable único de inmunoglobulina.
7. El sistema de cualquier reivindicación precedente, en el que la serie de unidades cromatográficas comprende:
- (a) cromatografía de proteína A y cromatografía de intercambio aniónico de flujo;
- 40 (b) cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico de flujo y cromatografía de intercambio catiónico;
- (c) cromatografía de proteína A realizada en presencia de Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5;

(d) cromatografía de intercambio aniónico pasante realizada en presencia de Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; y/o

(e) cromatografía de intercambio catiónico realizada en presencia de acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0.

5 8. Un procedimiento de purificación de una proteína recombinante de una solución contaminada de la misma que comprende los pasos de (i) purificar la proteína en una serie de pasos de cromatografía usando un sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio, en el que los pasos de cromatografía comprenden cromatografía de afinidad y uno o más pasos de cromatografía adicionales elegidos entre: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de modo mixto, y en el que los pasos de la cromatografía son operados en modo de enlace eluyente o de flujo pasante, y en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprende: (a) un ácido orgánico, (b) un metal alcalino o una sal de amonio de la base conjugada del ácido orgánico de (a), y (c) una base orgánica; y en el que el sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio se usa en la serie de pasos de cromatografía, y (ii) recuperar la proteína purificada.

15 9. Un procedimiento de purificación de una proteína recombinante de una solución contaminada de la misma por cromatografía de proteína A que comprende: (a) equilibrar una proteína A inmovilizada en una fase sólida con una solución tampón de equilibrio de proteína A que comprende Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la proteína A inmovilizada en la fase sólida; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con una primera solución tampón de lavado de proteína A que comprende base Tris 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato sódico 300 mM, a aproximadamente pH 7,5; y (d) recuperar la proteína de la fase sólida con una solución tampón de elución de proteína A que comprende acetato de sodio 1,8 mM, ácido acético 28,2 mM, a aproximadamente pH 3,6, el procedimiento comprende además cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico, y en el que todas las soluciones tampón están hechas sin la adición de NaCl y en el que los componentes del sistema de tampón de múltiples componentes libre de cloruro de sodio comprenden un ácido acético, un metal alcalino de la base conjugada del ácido acético y una Tris-Base.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además el siguiente paso después del paso (c) y antes del paso (d): eliminar contaminantes lavando la fase sólida con una segunda solución tampón de lavado de proteína A que comprende base Tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5, en el que la segunda solución tampón de lavado de proteína A es preparada sin la adición de NaCl.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, que comprende además los siguientes pasos después del paso (d): (e) valorar la solución que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con Tris 1 M.

12. El procedimiento de la reivindicación 11 que comprende además filtrar la solución producida por la etapa (g) de la reivindicación 11.

13. El procedimiento de la reivindicación 11 o 12, que comprende la purificación de la proteína recombinante de la solución producida por el paso (g) de la reivindicación 11, o la solución filtrada de la reivindicación 12,

40 por cromatografía de intercambio aniónico que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio aniónico con una solución de tampón de equilibrio de intercambio aniónico que comprende Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5; (b) aplicar la solución contaminada a la matriz de intercambio aniónico y recoger el primer flujo; y (c) aplicar una solución tampón de lavado de intercambio aniónico que comprende Tris-Base 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,5 a la matriz de intercambio aniónico y recoger el segundo flujo, en el que todas las soluciones tampón se hacen sin la adición de NaCl.

14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que:

(a) el primer flujo y el segundo flujo son combinados en una única solución de flujo pasante combinado; y/o

(b) el pH del primer flujo, el segundo flujo y la solución de flujo combinado único se ajusta a aproximadamente pH 5,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM.

50 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende purificar la proteína recombinante de la solución contaminada seleccionada del primer flujo de las reivindicaciones 11 o 12, el segundo flujo de las reivindicaciones 11 o 12, la solución combinada de flujo único de la reivindicación 13, y el flujo ajustado a pH producido por la reivindicación 14(a),

55 mediante cromatografía de intercambio catiónico que comprende: (a) equilibrar una matriz de intercambio catiónico con una solución tampón de equilibrio de intercambio catiónico que comprende acetato sódico 25 mM, ácido acético

- 5 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0; (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la matriz de intercambio catiónico; (c) eliminar contaminantes lavando la fase sólida con una primera solución tampón de lavado de intercambio catiónico que comprende acetato de sodio 25 mM, ácido acético 12,1 mM, a aproximadamente pH 5,0; y (d) recuperar la proteína de la fase sólida con una solución tampón de elución de intercambio catiónico que comprende acetato de sodio 175 mM, ácido acético 75 mM, a aproximadamente pH 5,0, en el que todas las soluciones de tampón son preparadas sin la adición de NaCl.

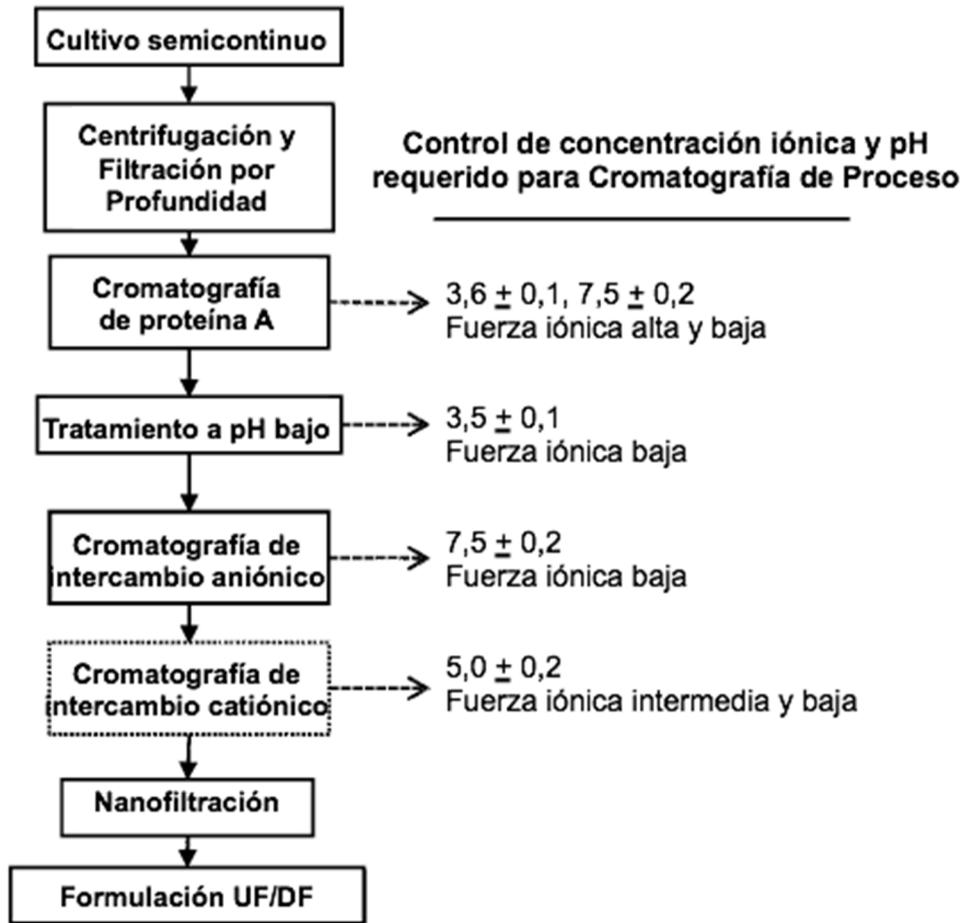


Figura 1. Diagrama de flujo de procesos corriente abajo para plataforma mAb. Se muestran Intervalos de fuerza iónica y pH claves para control de cromatografía de proceso.

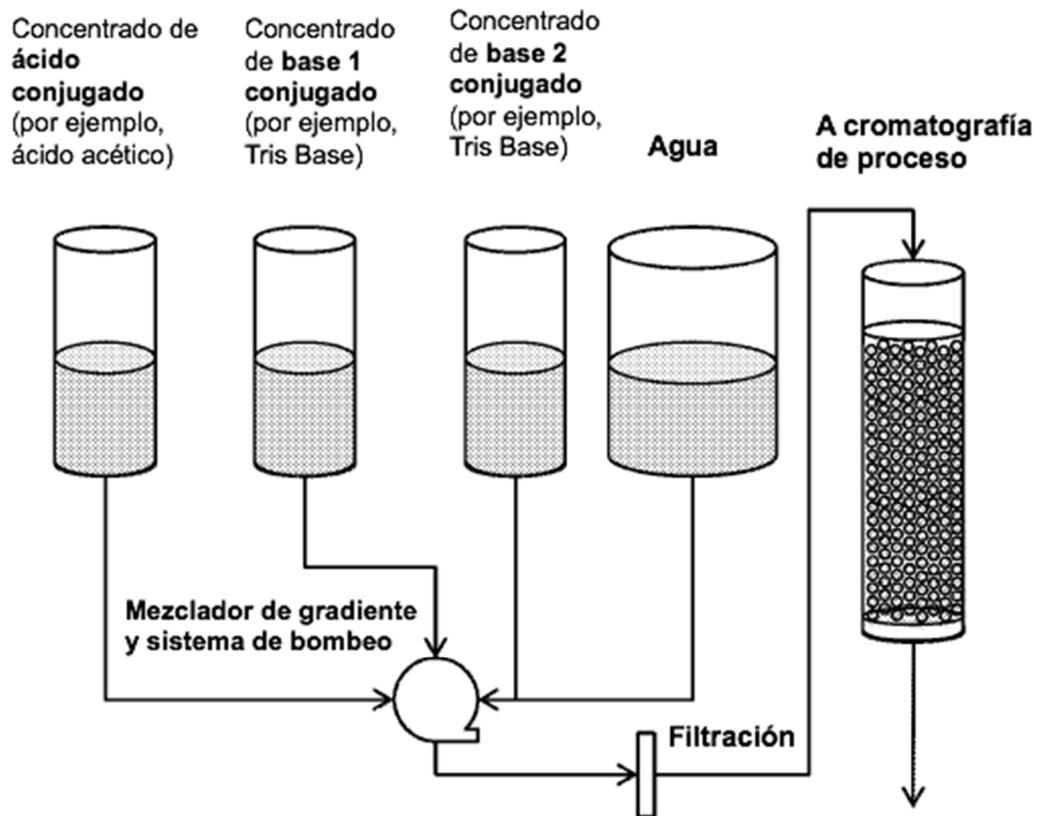


Figura 2. Diagrama de preparación de tampón a gran escala ideal a partir de concentrados para minimización de materias primas y requerimientos de tanque

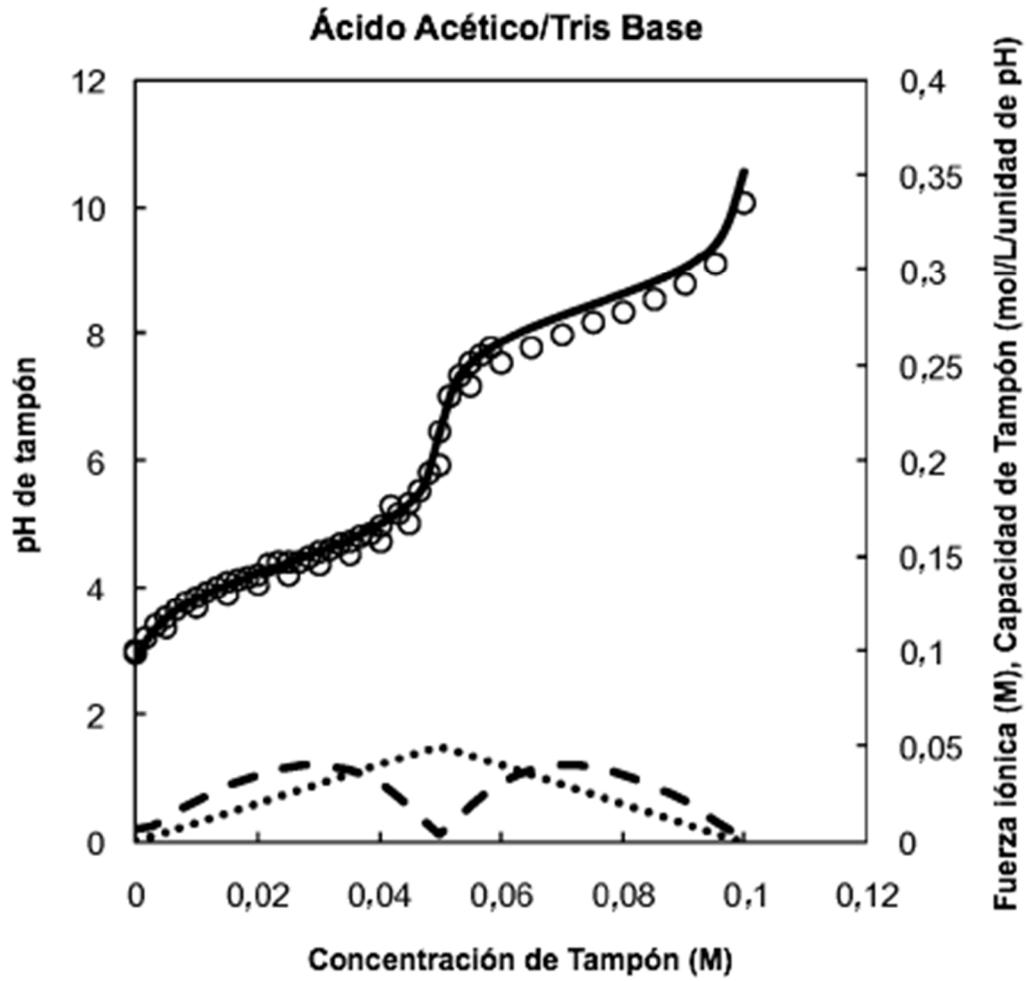


Figura 3. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH de sistema de tampón Tris base y ácido acético.

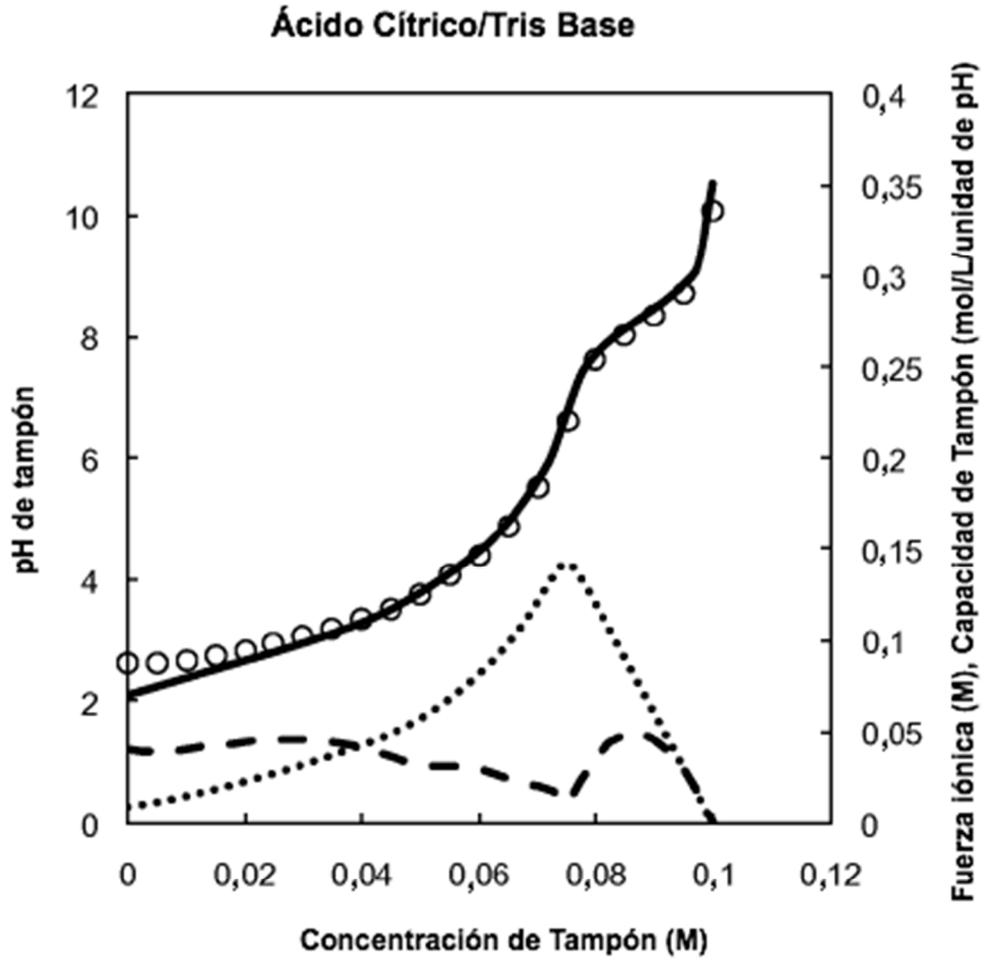


Figura 4. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH para sistema de tampón Tris base y ácido cítrico.

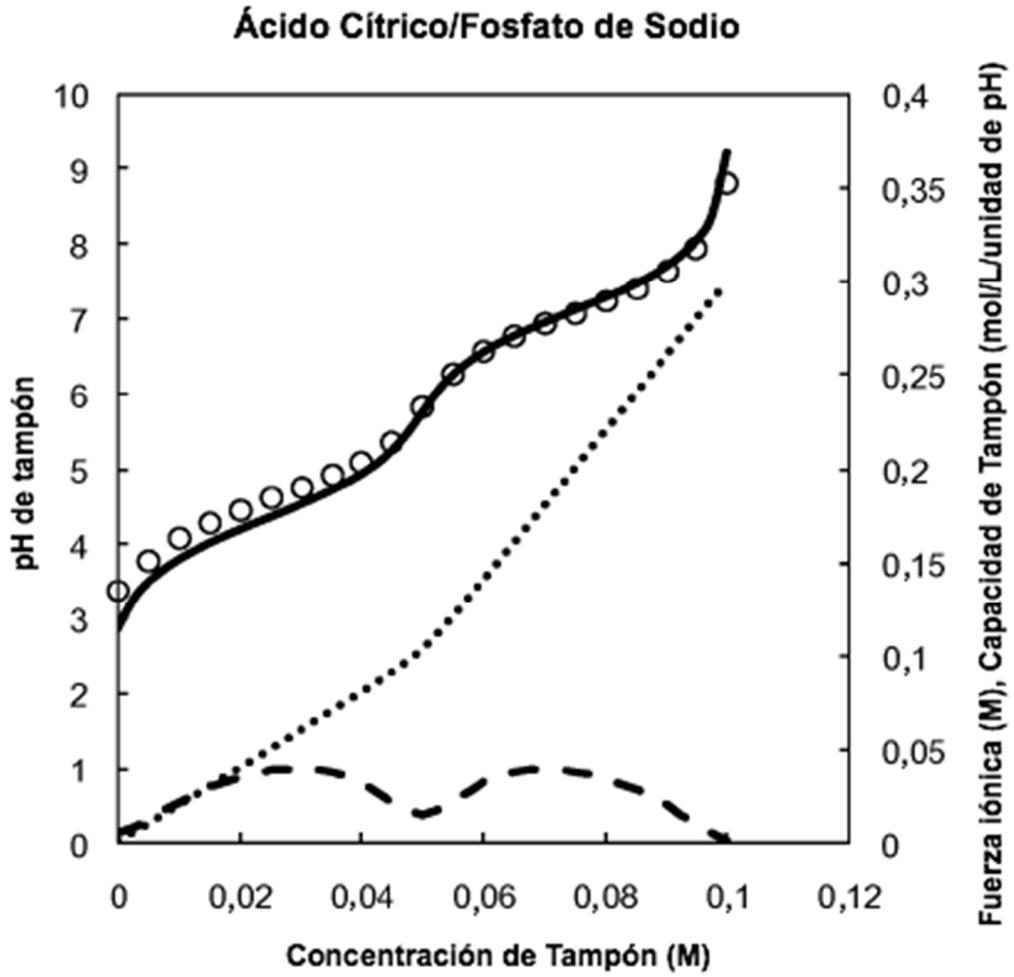


Figura 5. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH para sistema de tampón de fosfato de sodio y ácido acético.

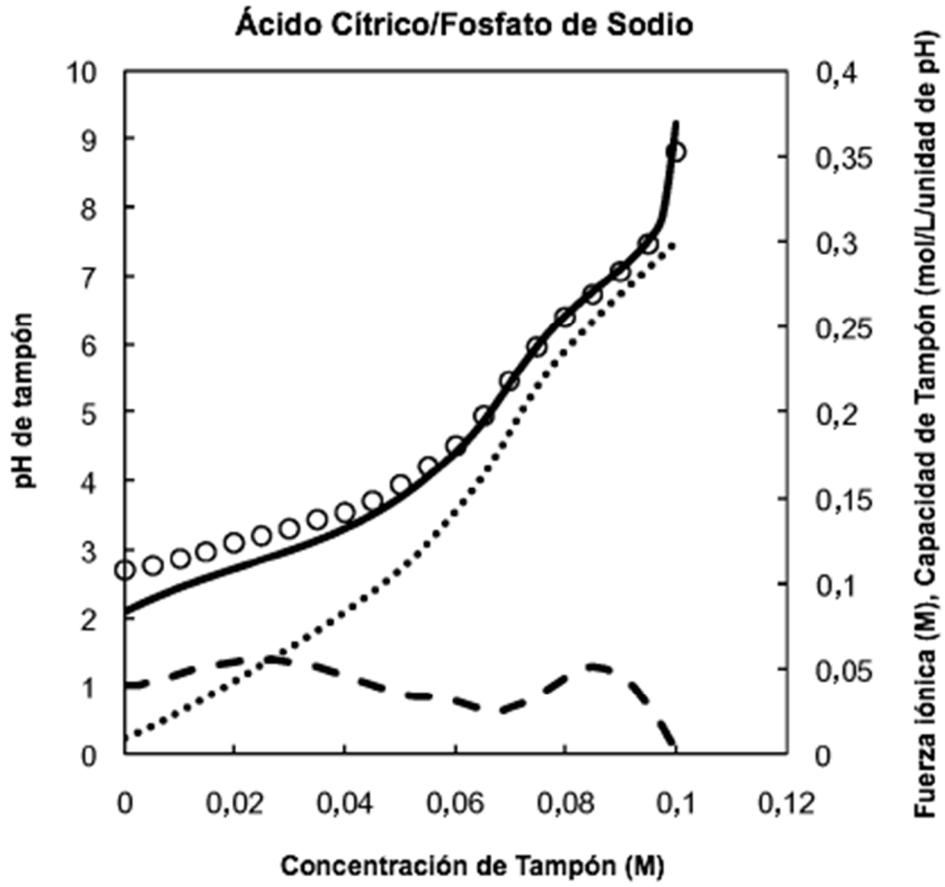


Figura 6. Curvas experimentales y calculadas de capacidad de tampón, fuerza iónica y pH para sistema de tampón de fosfato de sodio y ácido cítrico.