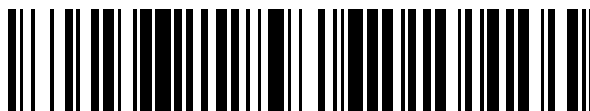


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 749**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01)
C07K 1/22	(2006.01)
B01J 39/26	(2006.01)
B01J 41/20	(2006.01)
C07K 16/06	(2006.01)
C07K 1/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2015 PCT/EP2015/054862**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135884**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2015 E 15708522 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3116891**

54 Título: **Purificación de inmunoglobulina con el uso de etapas de limpieza previa**

30 Prioridad:

10.03.2014 HU P1400131
09.02.2015 HU P1500053

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2020

73 Titular/es:

RICHTER GEDEON NYRT. (100.0%)
Gyömr i út 19-21
1103 Budapest, HU

72 Inventor/es:

FELFÖLDI, FERENC;
BENKÖ, ZSUZSA y
GÁSPÁR, MELINDA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 784 749 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

Purificación de inmunoglobulina con el uso de etapas de limpieza previa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de purificación de anticuerpos a partir de una composición derivada de cultivos celulares con el uso de etapas de limpieza previa antes de una etapa de captura y/o etapas de pulido adicionales posteriores a la etapa de captura.

Antecedentes de la invención

10 La selección de secuencias posteriores eficientes y económicas para la purificación de polipéptidos producidos por tecnología de ADN recombinante es una etapa crucial en el desarrollo de cada nuevo producto biofarmacéutico destinado al uso terapéutico. En el pasado reciente, la necesidad de procedimientos de purificación a gran escala para anticuerpos monoclonales (mabs), debido a sus dosis terapéuticas excepcionalmente altas en uso médico, se ha intensificado aún más con el uso de procedimientos de cultivo celular mejorados que resultan en densidades celulares más altas y tasas de expresión más altas. Las concentraciones crecientes en los fluidos de cultivo del producto y los contaminantes establecen mayores demandas en la cromatografía de captura, en sus etapas anteriores de clarificación de la muestra y en las cromatografías de pulido posteriores. Todo el procedimiento corriente abajo tiene que: (i) gestionar una masa de producto aumentada, (ii) eliminar eficientemente el aumento de las impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto según los criterios de aceptación definidos a continuación, y (iii) mantener los rendimientos económicos y la calidad suficiente del mab. Por lo general, el procedimiento corriente abajo representa una parte importante de los costos totales de fabricación de los anticuerpos terapéuticos.

20 Los mabs en fracciones crudas se asocian típicamente con impurezas tales como proteínas de la célula huésped (HCP), ADN de la célula huésped, virus, agregados, otras variantes de productos no deseados y varios lixiviados de los materiales del procedimiento. La presencia de estas impurezas es un riesgo potencial para la salud de los pacientes y, por lo tanto, su ausencia del producto final es un requisito reglamentario. Solo se tolerarán cantidades residuales muy bajas.

25 El procedimiento clásico para purificar polipéptidos derivados de cultivos celulares sigue la secuencia de cromatografías de captura-intermedio-pulido, acompañadas de etapas de filtración, concentración o diálisis en varias posiciones de la secuencia corriente abajo. En los últimos años, se han establecido con éxito enfoques de plataforma en el campo de la purificación de mab. Dado que los mabs son una clase bien definida de glicoproteínas que poseen propiedades fisicoquímicas comunes, el uso de un procedimiento de plataforma genérica es razonable (Kelly B 2009).
30 Un procedimiento universal de ese tipo, con adaptaciones más o menos específicas del producto, puede aplicarse a muchos mabs, especialmente para las inmunoglobulinas de la misma clase o subclase, por ejemplo, IgG1.

Una de las etapas de captura usada con máxima frecuencia para la purificación de mab es la cromatografía de afinidad con proteína A. Esta captura ofrece una selectividad excepcional para las moléculas que portan Fc, eliminando de ese modo, más del 99,5 % de contaminantes en una sola etapa. Sin embargo, además de sus ventajas, también deben mencionarse dos desventajas. Un inconveniente es la lixiviación no deseada de la proteína A o fragmentos de proteína A que se sabe que son tóxicos (Gagnon P 1996). La otra desventaja es el alto costo de este tipo de resina, particularmente en la escala industrial necesaria para purificar anticuerpos terapéuticos. Una resina de proteína A es aproximadamente 30 veces más cara que una resina de intercambio iónico. Se calculó que para el procesamiento corriente abajo de un cultivo celular 10 m³ el costo de la cromatografía de afinidad de proteína A es de aproximadamente 4-5 millones de dólares (Farid SS 2009).
35

Se han publicado muchas soluciones para superar el problema de la proteína A lixiviada (Gagnon P 1996; Fahrner RL 2001). Varios enfoques relacionados con las etapas cromatográficas posteriores a la proteína A que eliminan la proteína A lixiviada, como la cromatografía de intercambio iónico usada en el modo de unión (EP0345549) o modo de flujo continuo (documento WO2004076485), cromatografía de intercambio catiónico (documento WO2009058812), cromatografía de interacción hidrofóbica (documento WO9522389), o combinaciones de cromatografías, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico seguida de cromatografía de interacción hidrofóbica (documento WO2010141039), cromatografía de intercambio iónico seguida de cromatografía de intercambio catiónico (documento WO2011090720), o la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de modo mixto en cualquier orden (documento WO2011150110). Dado que el grado general de pureza requerido para un anticuerpo terapéutico es extremadamente alto, un esquema de purificación de plataforma típica consiste en al menos dos cromatografías posteriores a la proteína A que generalmente se seleccionan de la cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio iónico en flujo continuo y cromatografía de interacción hidrofóbica (Fahrner RL 2001, Kelly B 2009, documentos WO9522389, WO2009138484, WO2010141039, WO2011017514, WO2011090720).
40

Otros enfoques ya reducen los lixiviados durante la cromatografía de afinidad de proteína A mediante el uso de etapas de lavado especiales que eliminan la proteína A lixiviada antes de eluir la inmunoglobulina. Se desarrollaron muchos tampones de lavado intermedios que contienen sales o componentes adicionales, por ejemplo, electrolitos hidrofóbicos tal como cloruro de tetrametilamonio (Fahrner RL 2001).
45
50
55

Algunos procedimientos surten efecto más cerca de la fuente de la lixiviación de la proteína A al reducir directamente las actividades proteolíticas que se originan en la muestra. Una parte importante de la lixiviación de la proteína A es causada por la proteólisis. Tal lixiviación reducida se logró mediante bajas temperaturas y/o agregando inhibidores de proteasa a los tampones (documento WO2005016968).

- 5 Un procedimiento especial para evitar o reducir la lixiviación de la proteína A que comprende el pretratamiento de la resina de la proteína A con compuestos tensioactivos, por ejemplo, sustancias caotrópicas tales como urea o guanidina-HCl (documento WO03041859).

10 Se sabe desde hace mucho tiempo que los diferentes tipos de resinas de proteína A muestran diferentes grados de lixiviación (Füglister P 1989). Por lo tanto, la selección del material de proteína A es un factor importante. Además del ligando en sí, además la matriz del esqueleto influye en la lixiviación, la capacidad de unión y las tasas de flujo (Fahrner RL 2001). Estos parámetros en conjunto definen el tamaño de la columna, el tiempo del procedimiento y, por lo tanto, la economía de la etapa de captura de afinidad. Además, durante la década anterior, los proveedores de cromatografía han desarrollado ligandos de proteína A más robustos proporcionados por la ingeniería genética de la secuencia natural de la proteína A de *Staphylococcus aureus*.

15 Estas resinas mejoradas consisten en una matriz rígida en combinación con una proteína ligando recombinante mejorada especialmente diseñada para permitir tolerancia a los álcalis, alta capacidad de unión y baja pérdida de ligando. Un ejemplo es MabSelect SuRe™ de GE Healthcare Life Sciences (documento WO2009138484). Este material puede limpiarse rápida y eficientemente después de la corrida con hasta NaOH 0,5 M. Sin embargo, estos beneficios tienen un precio. MabSelect SuRe y las resinas modernas comparables son considerablemente más caras que la generación anterior de resinas de Proteína A. Por lo tanto, a pesar de estos nuevos medios de afinidad, no hay beneficio económico, más bien lo contrario es cierto.

En vista de los costos muy altos asociados con la captura de afinidad basada en la proteína A, no es sorprendente que se hayan desarrollado estrategias alternativas que eviten completamente cualquier uso de una cromatografía de afinidad para la purificación de inmunoglobulinas.

- 25 Un ejemplo es el uso de la filtración en flujo tangencial de alto rendimiento en combinación con cromatografías de no afinidad, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de modo mixto (documento WO03102132).

30 En muchos casos, las etapas de captura se realizan con materiales de entrada de crudo (carga), lo que puede causar la contaminación de (acumulación de impurezas en) la resina de la columna de afinidad. En ausencia de una etapa de regeneración adecuada, esto puede evitar la reutilización exitosa de la resina de captura. En el caso de la captura de afinidad con la proteína A, debe enfatizarse que la lixiviación de ligandos no es el factor principal para limitar el tiempo de vida de la resina de proteína A. Los contaminantes en los fluidos de cultivo en bruto, como lípidos, oxidantes, agregados o partículas, iones metálicos y otras sustancias promueven la contaminación de las resinas. Además de los efectos directos sobre las porciones de unión a la proteína A, además la matriz puede contaminarse irreversiblemente. Las capacidades y tasas de flujo reducidas de una corrida a otra son la consecuencia. Este problema no se limita a las resinas de proteína A: la contaminación de las resinas cromatográficas durante su tiempo de vida operativa es un problema general significativo para las bioseparaciones comerciales. Los ligandos hidrofóbicos utilizados para la cromatografía de interacción hidrofóbica y la cromatografía de modo mixto, cuando se utilizan como etapas de captura para las inmunoglobulinas derivadas de cultivos celulares, son especialmente susceptibles de atrapar contaminantes lipofílicos de los fluidos de cultivo. A pesar de los sofisticados protocolos para las etapas de limpieza posteriores a la corrida, la vida útil de una columna de captura es limitada y depende del número de ciclos, las condiciones de funcionamiento para la corrida y la limpieza, y la pureza de la muestra.

45 La cromatografía en modo mixto se describió principalmente como una opción para una etapa de pulido corriente abajo de la proteína A (documento WO03102132 de Kelly, B. 2009). Se conoce el uso de Capto MMC en el modo de unión para la purificación de mAb. Se desarrollaron condiciones especiales de elución (documento WO2011049798). Del mismo modo, se demostró que CaptoAdhere, preferentemente en el modo de flujo continuo, es una etapa de pulido adecuado después de una cromatografía de intercambio iónico de flujo continuo realizada después de una cromatografía de afinidad de proteína A (documento WO2013066707). Además, se investigaron algunas resinas de modo mixto diferentes en un modo de sobrecarga y cromatografía de elución y CaptoAdhere fue la de máxima preferencia (documento WO2013067301).

55 Para aclarar los fluidos de cultivo altamente contaminados, se han empleado etapas de separación mecánica que eliminan la mayoría de los desechos y agregados celulares. La centrifugación y la filtración son las etapas de pretratamiento más comunes que se realizan antes de cargar la muestra en la resina de captura. Para grandes volúmenes, la centrifugación se realiza mediante separadores de células y etapas de filtración se realizan mediante filtros de profundidad y/o microfiltros. El fluido de cultivo resultante se denomina "sobrenadante de cultivo celular clarificado" (Liu HF 2010). Aunque la carga directa del fluido de cultivo cosechado en la resina de proteína A es un procedimiento frecuente de elección (Fahrner RL 2001), otras tecnologías de plataforma utilizan las etapas de clarificación, es decir, centrifugación, filtración profunda y/o microfiltración (Liu HF 2010, documentos WO9522389, WO2001150110) para proteger la columna de captura.

5 Las etapas cromatográficas de limpieza previa realizadas alternativamente o adicionalmente a la centrifugación/filtración solo se han informado esporádicamente. El uso de cromatografía de quelato de metal inmovilizado (Zn²⁺) (IMAC) en modo de unión se usó antes de la proteína A en una escala muy pequeña (VanDamme A.-M.1990, Bulens F. 1991). En contraste, se usó una cromatografía de intercambio iónico débil en DEAE Celulosa después de la centrifugación, filtración y concentración, y el flujo obtenido se cargó en la proteína A (documento EP0550400). Finalmente, se investigaron las ventajas de la filtración profunda para el pretratamiento de los fluidos de cultivo antes de la proteína A y se comparó con una cromatografía de intercambio iónico menos efectiva en TMAE Fractogel en el modo de flujo continuo (Yigsaw y 2006).

10 Luhrs y otros, (2009) se refieren al problema de la purificación de un anticuerpo anti-histona a partir de histonas en las condiciones artificiales de purificación del anticuerpo que se enriquece con histonas y ADN.

Otro estudio sobre la purificación por cromatografía de anticuerpos monoclonales se ha realizado por Ishihara Kadoya que muestra un procedimiento estandarizado para establecer las condiciones del procedimiento de purificación, que podría aplicarse a los anticuerpos monoclonales humanos para la fase temprana del desarrollo farmacéutico (Ishihara T y Kadoya T. 2007).

15 Gagnon P. revisó las tendencias tecnológicas en la purificación de anticuerpos en el que, entre otros procedimientos, se discuten los procedimientos cromatográficos (Gagnon P., 2012).

El documento WO2005082483 se refiere a un procedimiento para la purificación de anticuerpos de una o más impurezas en un líquido.

20 El documento WO2006024497 divulga un procedimiento para purificar anticuerpos y otras proteínas de productos concomitantes con la eliminación de agregados formados a partir de una sola especie de proteínas productos.

El documento EP0299746 divulga un procedimiento para purificar el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) que comprende el intercambio iónico secuencial, afinidad de ligando colorante, filtración en gel y cromatografía de fase inversa.

25 El documento WO9118975 se refiere a un procedimiento para purificar la transcriptasa inversa recombinante del virus de inmunodeficiencia humana (HIVRT).

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a la purificación de inmunoglobulinas y al problema de proporcionar un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una manera eficiente y rentable y con una pureza y rendimiento satisfactorios. En particular, la presente invención aborda el aspecto de la reutilización de los materiales de cromatografía bastante costosos, en particular la vida útil de los materiales de cromatografía utilizados en la etapa de captura del procedimiento corriente abajo, y cómo esto puede aumentarse al reducirse la complejidad técnica del procedimiento de purificación.

35 Los procedimientos convencionales de cromatografía corriente abajo para la purificación de inmunoglobulinas a partir de fluidos de cultivo celular, generalmente, comienzan con una etapa de cromatografía de captura en la que la inmunoglobulina tiene que ser capturada de una muestra que comprende la inmunoglobulina junto con las impurezas. La inmunoglobulina se separa de las impurezas en gran parte como resultado de la unión selectiva de la inmunoglobulina a la resina cromatográfica de captura, mientras que las impurezas no se unen a la resina y, por lo tanto, se obtienen en el flujo continuo, mientras que la inmunoglobulina se obtiene en el eluato.

40 Esta etapa de cromatografía de captura suele ser la etapa más costosa en la purificación de inmunoglobulinas, que representa del 40 al 50 % de los costos generales del procedimiento corriente abajo. La etapa de captura es particularmente costosa cuando se usa una cromatografía de afinidad de proteína A. Lo mismo se aplica a las columnas de cromatografía de modo mixto, que alternativamente pueden usarse como una etapa de cromatografía de captura en la purificación de inmunoglobulinas.

45 Existe una necesidad continua de purificación rentable de inmunoglobulinas a partir de grandes volúmenes de fluido de cultivo celular y caldo de fermentación y de muestras derivadas de tal fluido o caldo. En particular, existe la necesidad de procedimientos de purificación que sean rentables y aun así eficientes y satisfactorios en términos de pureza y rendimiento.

50 Se ha encontrado que al incorporar una etapa de cromatografía adicional corriente arriba de la etapa de cromatografía de captura, el gasto general del procedimiento de purificación puede reducirse significativamente. La etapa de cromatografía adicional corrientes arriba de la etapa de cromatografía de captura reduce la carga de impurezas a la que está expuesto el material de cromatografía de captura, que es costoso. Esta etapa también denominada de "limpieza previa" se lleva a cabo con el uso de material de cromatografía que es menos costoso y más robusto en comparación con el material de cromatografía utilizado en la etapa de captura posterior y es fácil de regenerar.

Para mantener el procedimiento de purificación lo más simple posible, en una realización preferente, la etapa de limpieza previa se realiza en el modo de flujo continuo, es decir, la inmunoglobulina a purificar no está unida por la resina y, por lo tanto, se obtiene en la fracción de flujo continuo, mientras que las impurezas se retienen en gran medida en la resina y, por lo tanto, se separan de la inmunoglobulina.

- 5 En una realización preferente adicional, la etapa de limpieza previa y la etapa de captura están conectadas en serie, de modo que el flujo continuo de la etapa de limpieza previa no se almacena temporalmente en un recipiente colector, sino que se pasa inmediatamente a la resina de cromatografía de captura.

10 Para lograr la alta pureza requerida de la inmunoglobulina destinada al uso terapéutico, la etapa de limpieza previa y la etapa de cromatografía de captura son seguidas por una o más etapas de pulido cromatográfico después de la etapa cromatográfica de captura.

El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante la provisión de un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 15 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

- 20 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

- (c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido; en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (c) de al menos 10 con respecto a los virus envueltos,

25 en el que la muestra se cosecha en fluido de cultivo celular, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado.

La invención resuelve además el problema de aumentar la seguridad viral en un procedimiento de fabricación de una inmunoglobulina.

La invención se define por las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1: Esquemas de proceso de procedimientos de purificación convencionales para inmunoglobulinas**
La Figura 1A muestra un esquema de proceso universal para la purificación de inmunoglobulinas de grandes volúmenes de cultivos celulares. El procedimiento que comenzó a partir del material a granel clarificado, que se obtiene después de la centrifugación y/o filtración del fluido de cultivo cosechado, consiste en una etapa de captura de Proteína A y dos etapas de pulido posteriores. Este esquema incluye dos etapas típicas de seguridad de virus.
35 Se realiza una etapa de inactivación del virus manteniendo el eluato de Proteína A a pH bajo y se realiza una etapa de nanofiltración para la eliminación del virus después de la última etapa de pulido. La etapa final es normalmente una ultrafiltración y/o diafiltración de flujo tangencial (UF/DF-TFF) para establecer las concentraciones deseadas de la inmunoglobulina y las de los ingredientes de la formulación.

40 La Figura 1B muestra un esquema de proceso clásico para la purificación de inmunoglobulinas de grandes volúmenes de cultivos celulares que consisten en tres cromatografías (por ejemplo, de acuerdo con Fahrner RL 2001 o Kelly B. 2009). Es el mismo procedimiento que en la Figura 1A, excepto que las etapas de pulido se divulgan que sea una cromatografía de intercambio catiónico (etapa de pulido 1) seguida de una cromatografía de intercambio iónico (etapa de pulido 2). Debe enfatizarse que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en un modo de unión, mientras que la cromatografía de intercambio iónico se realiza en un modo de flujo continuo.
45 Cabe mencionar que una variante equivalente aplicada frecuentemente de este esquema clásico es simplemente cambiar el orden de las etapas 1 y 2 de pulido.

Figura 2: Esquemas de proceso ilustrativos de la invención que usan etapas de limpieza previa Figura 2A:
Muestra un esquema de proceso a gran escala con etapas de limpieza previa antes de una etapa de captura de Proteína A. El fluido de cultivo celular cosechado se clarifica mediante centrifugación preparativa con el uso de un separador seguido de una filtración profunda y una microfiltración. La etapa de cromatografía de limpieza previa se realiza mediante el uso de una columna de intercambio iónico en el modo de flujo continuo. En una configuración preferida, la columna de limpieza previa se conecta directamente a la columna de cromatografía de captura, que es la Proteína A. Las dos etapas de pulido son una cromatografía de intercambio catiónico utilizada en el modo de unión y elución (etapa de pulido 1) seguido de una cromatografía de modo mixto (etapa de pulido 2). La resina de modo mixto tiene ligandos cargados positivamente y puede realizarse ya sea en el modo de unión o en el modo
50
55

de flujo continuo. Esta segunda etapa de pulido es opcional. Las etapas de seguridad viral y la UF/DF-TFF final se divulgan en la Figura 1A.

La Figura 2B muestra un esquema de proceso alternativo a gran escala que es similar al procedimiento de la Figura 2A, excepto que entre la cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa y la cromatografía de afinidad de Proteína A se inserta una cromatografía de modo mixto adicional. Esta cromatografía de modo mixto se realiza ya sea con una resina que contiene ligandos cargados negativamente (por ejemplo, Capto MMC) o con una resina que contiene ligandos cargados positivamente o sin carga (por ejemplo, MEP HyperCel) y se realiza en el modo de unión. Por lo tanto, la cromatografía de modo mixto funciona como la etapa de captura en este procedimiento, mientras que la cromatografía de afinidad de Proteína A se define mejor como una etapa intermedia dentro de este esquema. La segunda etapa de cromatografía de modo mixto como la última cromatografía es opcional. Todas las demás etapas son como se describe en la Figura 2A.

La Figura 2C muestra otro esquema de proceso alternativo a gran escala que es similar al procedimiento de la Figura 2A, excepto que la cromatografía de captura de Proteína A se reemplaza por una cromatografía de captura de modo mixto. Esta cromatografía de modo mixto se realiza ya sea con una resina que contiene ligandos cargados negativamente (por ejemplo, Capto MMC) o con una resina que contiene ligandos cargados positivamente o sin carga (por ejemplo, MEP HyperCel) y se realiza en el modo de unión. A diferencia del procedimiento que se muestra en la Figura 2B, este procedimiento carece de una cromatografía de afinidad de Proteína A. Todas las demás etapas son como se describe en la Figura 2A.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria, una "muestra" o "muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza" comprende una inmunoglobulina de interés y al menos una impureza. La muestra puede obtenerse directamente de una célula u organismo huésped que produce la inmunoglobulina. La muestra puede ser un fluido de cultivo celular cosechado, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado. La muestra puede haber sido parcialmente clarificada o purificada por centrifugación y/o filtración, por ejemplo, microfiltración, diafiltración, ultrafiltración y filtración profunda.

Como se usa en la presente memoria, el término "muestra pretratada" es, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular que se ha preparado para una etapa de cromatografía usada en un procedimiento de la invención, por ejemplo sometiendo la muestra a uno o más ajustes que consisten en intercambio de tampón, dilución, adición de sales, detergentes, sustancias caotrópicas, o compuestos orgánicos, titulación o filtración del pH para ajustar el pH y/o el intervalo de conductividad y/o la capacidad de amortiguación para lograr un rendimiento de cromatografía deseado y estabilizar la inmunoglobulina. Como las inmunoglobulinas expresadas a partir de células de mamíferos normalmente se secretan en el fluido de cultivo celular durante el procedimiento de cultivo, la cosecha del producto al final del procedimiento de cultivo se produce separando el fluido de cultivo celular de las células. El procedimiento de separación celular debe ser suave para minimizar la ruptura celular para evitar el aumento de los desechos celulares y la liberación de proteasas y otras moléculas que podrían afectar la calidad del producto de inmunoglobulina. Normalmente, la cosecha de cultivos de células de mamíferos se somete a centrifugación seguida de filtración. La cromatografía de adsorción en lecho expandido es un procedimiento alternativo para evitar los métodos de centrifugación/filtración. Otros tratamientos de la muestra antes de la purificación mediante etapas cromatográficas pueden ser concentrar y/o diafiltrar el sobrenadante del cultivo celular en una concentración específica de inmunoglobulina, intervalo de pH, conductividad, y concentración de especies tampón.

Los términos "impureza" y "contaminante" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a cualquier material que sea diferente a la inmunoglobulina de interés. Los ejemplos pueden ser componentes de fluido de cultivo celular, proteínas de células huésped, endotoxinas, virus, lípidos, ADN, ARN, lixiviados de materiales de procedimiento, y agregados o fragmentos de estos. Además se consideran como impurezas los agregados, variantes de carga, moléculas mal plegadas o fragmentos de la inmunoglobulina de interés que se purifica.

Como se usa en la presente memoria, el término "medios de cromatografía" o "medio de cromatografía" debe entenderse como un material o medio de cromatografía en forma de perlas, placas, cristales, monolitos, membranas, fibras, malla de fibras o cualquier otra fase sólida. Los "medios" llevan grupos funcionales denominados "ligandos" unidos a un esqueleto denominado "matriz". Una excepción son las resinas de cromatografía en gel para cromatografía de exclusión por tamaño que típicamente no tienen ligando unido. Por lo tanto, el término "medios" no limita los procedimientos de la invención a solo cromatografía en columna que emplea resinas de cromatografía, sino que además incluye otros tipos de cromatografía, por ejemplo, cromatografía de membrana que emplea adsorbentes de membrana. Particularmente, en la cromatografía de intercambio iónico, la invención comprende tanto una resina de intercambio de cromatografía aniónica como un adsorbente de membrana de cromatografía de intercambio iónico.

"Resina" significa cualquier material o medio cromatográfico en forma de perlas que comprende una matriz con un grupo funcional unido (ligando) que puede interactuar con la proteína o al menos un contaminante. Una excepción son las resinas de cromatografía en gel para cromatografía de exclusión por tamaño que típicamente no tienen ligando unido. Las resinas pueden suministrarse como perlas de diferentes tamaños y empaquetarse en columnas. Alternativamente, pueden comprarse columnas preempaquetadas.

El término "modo de unión" o "modo de unión y elución" se refiere a condiciones de cromatografía en las que una muestra que contiene la inmunoglobulina a purificar se aplica a un medio de cromatografía, en el que la inmunoglobulina se une al medio de cromatografía. Así, la inmunoglobulina se retiene en el medio de cromatografía, mientras que las impurezas de la muestra pueden estar presentes en la fracción no unida, además denominada fracción de flujo continuo. Cuando se lleva a cabo una etapa de cromatografía en el modo de unión, pueden realizarse una o más etapas de lavado después de la unión de la inmunoglobulina al medio de cromatografía y antes de eluir la inmunoglobulina del medio. Para obtener la inmunoglobulina, la inmunoglobulina se eluye después y se obtiene en el eluato, que después puede purificarse en una etapa cromatográfica adicional, si se desea. La elución de la inmunoglobulina puede realizarse con el uso de condiciones selectivas que permiten que los contaminantes permanezcan unidos al medio mientras se eluye la inmunoglobulina.

Realizar una etapa de cromatografía en el "modo de unión" no significa necesariamente que el 100 % de la inmunoglobulina de interés se una. En el contexto de la presente invención, "unido a la resina de cromatografía" o "unido al medio de cromatografía" significa que al menos el 50 % de la inmunoglobulina se une, preferentemente al menos 75 % de la inmunoglobulina se une, con mayor preferencia al menos 85 % de la inmunoglobulina se une, y con preferencia superlativa, más del 95 % de la inmunoglobulina se une a la resina o al medio.

Los términos "modo de flujo continuo", "obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía, en el flujo continuo", y "obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de cromatografía, en el flujo" se refieren a condiciones de cromatografía en las que una muestra que contiene la inmunoglobulina de interés se aplica a la resina o medio de cromatografía, en el que la inmunoglobulina no se une a la resina de cromatografía, sino que está presente principalmente en la fracción que no se une a la resina o al medio y así se contiene en el flujo.

La realización de una etapa de cromatografía en el "modo de flujo continuo" no significa necesariamente que el 100 % de la inmunoglobulina de interés no se una y, así, se contiene en el flujo. En el contexto de la presente invención, "no unido a la resina de cromatografía" o "no unido al medio de cromatografía" significa que al menos 50 % de la inmunoglobulina no se une, preferentemente al menos 75 % de la inmunoglobulina no se une, con mayor preferencia al menos 85 % de la inmunoglobulina no se une, y con preferencia superlativa más del 95 % de la inmunoglobulina no se une a la resina o al medio. Las impurezas pueden unirse a la resina o al medio en este modo.

En el contexto de la presente invención, se entiende que la etapa de limpieza previa de la cromatografía de la invención se realiza en el modo de flujo continuo, mientras que la etapa de captura se considera la primera etapa de cromatografía que se realiza en el modo de unión.

En los experimentos que condujeron a la presente invención, se observó que el material de cosecha libre de células (sobrenadante clarificado) todavía contiene varias sustancias que, junto con la inmunoglobulina a purificar, se unen fuertemente a la resina de captura. Esto afecta la reutilización de la resina. De acuerdo con el hallazgo de la presente invención, la inserción de una columna de limpieza previa adecuada representa una buena solución para la purificación rápida adicional del fluido de cultivo clarificado. Al unir más impurezas, la columna de limpieza previa mejora la pureza de la muestra, reduce las contaminaciones críticas, y protege la costosa columna de afinidad. La columna de limpieza previa debe ser reutilizable y su regeneración debe ser posible por medios simples. Los más adecuados son los medios de cromatografía de intercambio iónico fuertes con matrices robustas, que llevan ligandos seleccionados del grupo de porciones de aminoetilo cuaternario, amonio cuaternario o trimetilamonio, por ejemplo según se proporciona por Nuvia Q. El uso de la columna de intercambio iónico de limpieza previa en el modo de flujo continuo tiene varias ventajas: La columna puede mantenerse relativamente pequeña y puede conectarse directamente a la columna de captura. Esta configuración evita la recolección y el almacenamiento temporales del eluato de intercambio iónico, reduce el número de etapas y mejora la economía del procedimiento. La columna de intercambio iónico podría ser seguida por una Proteína A o una resina de modo mixto (por ejemplo, Bakerbond ABx, Capto MMC, CaptoAdhere o MEP HyperCel) o cualquier otra resina de alto precio que sea difícil de regenerar.

El término "en el siguiente orden" debe entenderse que significa que las etapas del procedimiento mencionados se llevan a cabo en el orden indicado. Pueden incorporarse etapas de procedimiento adicionales antes, después y entre las etapas de procedimiento enumeradas.

La presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (c) de al menos 10 con respecto a los virus envueltos,

en el que la muestra se cosecha en fluido de cultivo celular, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado.

5 La presente divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

10 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de péptido/proteína de unión a inmunoglobulina, o a cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la
15 inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

20 La presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

25 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

30 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

35 La presente divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

40 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de péptido/proteína de unión a inmunoglobulina, o a cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

45 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

50 El término "etapa de procesamiento adicional" se refiere a cualquier etapa que se aplique comúnmente dentro de los protocolos de purificación de proteínas, tales como filtración, diálisis, inactivación de virus, dilución, concentración, ajustes de pH, ajustes de conductividad o una etapa de cromatografía intermedia. Puede aplicarse una etapa de procesamiento adicional entre todas las etapas de cromatografía de la invención. Puede aplicarse una etapa de cromatografía intermedia entre cualquiera de las etapas de cromatografía, excepto entre exponer la muestra a la cromatografía de intercambio iónico de la etapa (a) y exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a la

5 cromatografía de la etapa (b). Particularmente, el término "etapa de procesamiento adicional" se refiere a una etapa de cromatografía intermedia aplicada entre la cromatografía de captura y la cromatografía de intercambio catiónico. La etapa de cromatografía intermedia puede llevarse a cabo con cualquier medio de cromatografía. La etapa de cromatografía intermedia puede emplear cualquier tipo de cromatografía, que incluyen la cromatografía en columna y la cromatografía de membrana.

En una realización, entre exponer la muestra a la cromatografía de intercambio iónico de la etapa (a) y exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a la cromatografía de la etapa (b) no se aplica ninguna etapa de procesamiento adicional.

10 En otra realización, entre exponer la muestra a la cromatografía de intercambio iónico de la etapa (a) y exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a la cromatografía de la etapa (b) no se aplica filtración, por ejemplo, filtración estéril.

Etapa de limpieza previa: Cromatografía de intercambio iónico

15 El procedimiento de la invención implica como una etapa de limpieza previa una etapa de cromatografía de intercambio iónico en el modo de flujo continuo antes de la etapa de captura. El medio de cromatografía de intercambio iónico puede ser un medio de cromatografía de intercambio iónico fuerte o débil, que incluye membranas de intercambio iónico.

20 Se ha encontrado que esta etapa de cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa es capaz de retener eficientemente las impurezas que de cualquier otra forma podrían causar precipitación a pH ácido y unir moléculas de ácido nucleico del huésped tales como ADN y ARN. Además, se ha encontrado que las sustancias de la muestra cruda que promueven el ensuciamiento en una columna de captura cromatográfica se capturan previamente por la columna de intercambio iónico de limpieza previa y no pueden ingresar a la columna de captura posterior.

Además, la etapa de limpieza previa tiene un efecto significativo sobre la lixiviación de la Proteína A, que podría reducirse en gran medida con el uso de la cromatografía de limpieza previa.

25 Finalmente, se observó que en los casos donde se observaron precipitaciones y/o turbidez durante la etapa de retención del eluato de Proteína A para la inactivación del virus, este efecto se evitó completamente al usar una cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa. Como el medio de cromatografía de la etapa de limpieza previa se expone a la mayor carga de impurezas en el procedimiento de cromatografía, se necesita un procedimiento de regeneración y limpieza rápido, económico y eficiente para el medio de cromatografía de la etapa de limpieza previa. Se ha descubierto que la regeneración del medio de cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, resina o membrana) puede llevarse a cabo de manera eficiente con un protocolo rápido, barato y eficiente que comprende solo 30 unas pocas etapas. Para la regeneración del medio de cromatografía de intercambio iónico pueden emplearse condiciones duras que permitan la limpieza del medio de cromatografía en un corto tiempo sin afectar su función. La cromatografía de intercambio iónico se basa en las interacciones carga-carga entre las moléculas que se unen y las cargas inmovilizadas en la matriz. En la cromatografía de intercambio iónico, las moléculas que se unen se cargan negativamente y los grupos funcionales inmovilizados (ligandos) se cargan positivamente. Los medios de 35 cromatografía de intercambio iónico comúnmente usados son medios Q (ligandos de amina cuaternaria), resinas TMAE (ligandos de trimetilaminoetilo), y resinas DEAE (ligandos de dietilamino etilo). Sin embargo, generalmente, la etapa de cromatografía de intercambio iónico puede realizarse con todos los medios de intercambio iónico comunes disponibles en el comercio. Los medios de intercambio iónico pueden usarse en forma de columnas preempaquetadas o como membranas. Alternativamente, las resinas pueden comprarse como material a granel y las columnas empaquetadas por el usuario. No existen limitaciones específicas en cuanto a la capacidad y las dimensiones de las 40 columnas que no sean las habituales. El experto en la técnica conoce la cantidad de medio de cromatografía de intercambio iónico y el tamaño de la columna a usar. Esto depende de la escala general del procedimiento.

45 Los medios de cromatografía de intercambio iónico fuertes típicos que pueden usarse para el propósito de la invención comprenden grupos funcionales tales como: porciones aminoetilo cuaternario (QAE), las resinas incluyen, por ejemplo, Toyopearl QAE (disponible de Tosoh Bioscience, Alemania), Selectacel QAE (un derivado aminoetilo cuaternario de celulosa, disponible de Polysciences Inc., Pensilvania, Estados Unidos), QAE Sephadex (disponible de GE Healthcare, Alemania) y otros; porciones de amonio cuaternario (Q), las resinas incluyen, por ejemplo, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP, Q Sepharose CL-4B, Q Sepharose Big Beads, Source Q, Resource Q, Capto Q, Capto Q ImPres (todos disponibles de GE Healthcare, Alemania), Poros HQ (Applied Biosystems, Alemania), Q 50 HyperCel, Biosepra Q Ceramic HyperD (disponible en Pall, Nueva York, Estados Unidos) Macro Prep High Q (Bio-Rad, California, Estados Unidos), Toyopearl Super Q (disponible de Tosoh Bioscience, Alemania), UNOsphere Q (disponible de Bio-Rad, California, Estados Unidos), trimetilamonioetilo (TMAE) incluye, por ejemplo, Fractogel EMD TMAE (Merck KgaA, Alemania), y las resinas de trimetilamonio incluyen, por ejemplo, Nuvia Q (disponible de Bio-Rad, California, Estados Unidos).

55 Particularmente, se ha encontrado que los medios de cromatografía de intercambio iónico fuertes son efectivos al retener impurezas que de cualquier otra forma causan precipitación a pH ácido y se unen a moléculas de ácido nucleico del huésped tales como ADN y ARN.

Preferentemente, se usan medios de cromatografía de intercambio iónico fuertes que comprenden un ligando seleccionado del grupo que consiste en porciones de aminoetilo cuaternario (QAE), porciones de amonio cuaternario y porciones de trimetilamonio, excepto trimetilamonio etilo unido a una matriz polimérica de metacrilato.

5 Con mayor preferencia, la cromatografía de intercambio iónico puede ser una cromatografía de intercambio iónico fuerte que se realiza con el uso de una resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte que tiene grupos funcionales (ligandos) $-N(CH_3)_3^+$ (trimetilamonio; Nuvia Q disponible de Bio-Rad, California, Estados Unidos), o un medio que tiene características similares.

10 Así, una realización preferente de la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo;

15 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

20 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

Las características del intercambiador iónico fuerte Nuvia Q son las siguientes:

Grupo funcional:	$-N(CH_3)_3^+$
Capacidad iónica total	100-170 $\mu\text{eq/ml}$
Capacidad de unión dinámica	$\geq 170 \text{ mg/ml}$
Contraión de envío	Cl^-
Tamaño de la mediana de partícula	$85 \pm 15 \mu\text{m}$
Intervalo de velocidad de flujo lineal recomendado	50-600 cm/h
Estabilidad química	
NaOH 1,0 M (20 °C)	hasta 1 semana
HCl 1,0 M (20 °C)	hasta 5 semanas
Relación de compresión del lecho de gel	1,10-1,15 (volumen del lecho asentado/volumen del lecho empaquetado)
estabilidad del pH	
a corto plazo	2-14
a largo plazo	4-12
solución de envío al 20 %	etanol + NaCl
Regeneración	NaCl 1-2 M
Limpieza	NaOH 0,5-1,0
Condiciones de almacenamiento	etanol al 20 % o NaOH 0,01

25 En una realización preferente, el diámetro de la columna de intercambio iónico de limpieza previa es mayor que el diámetro de la columna de captura. En otra realización preferente, la altura del lecho de la columna de intercambio iónico de limpieza previa es más corta que la altura del lecho de la columna de captura. En la máxima realización preferente, el diámetro de la columna de limpieza previa es mayor que el diámetro de la columna de captura y la altura del lecho de la columna de intercambio iónico de limpieza previa es más corta que la altura del lecho de la columna de captura. Se requiere un mínimo de aproximadamente 10 cm de altura del lecho para la columna de intercambio iónico de limpieza previa para la captura óptima de las impurezas.

30 Algunos tipos de impurezas pueden unirse al medio no solo a través de la interacción iónica, sino además a través de la interacción hidrofóbica. La formación compleja además puede ocurrir. Dado que la etapa de cromatografía previa a la limpieza funciona como un filtro para contaminantes no deseados, que se adsorben fuertemente en el medio, es necesario desarrollar un procedimiento efectivo de regeneración y limpieza. Para eliminar la mayoría de las impurezas de la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte (por ejemplo, que tiene un ligando $-N(CH_3)_3^+$ tal como Nuvia

Q), después de su uso, el siguiente procedimiento de regeneración (limpieza en el lugar) puede usarse en el siguiente orden: (a) Solución A : Fosfato de Na 40 mM, urea 2M, NaCl 1,5 M, EDTA 10 mM, pH 7-8. (b) Solución B: NaCl 2M, ácido cítrico 100 mM. (c) Solución C: Agua (d) Solución D: NaOH 1M. (e) Solución E: NaOH 10 mM. Las soluciones A - E se pasan consecutivamente a través de la columna. La solución E puede usarse para el almacenamiento. Se recomienda llevar a cabo la regeneración en flujo inverso.

Preferentemente, las columnas de la limpieza previa y la etapa de captura pueden conectarse en serie. Esto significa que el flujo continuo de la etapa de limpieza previa no se almacena temporalmente en un recipiente colector, sino que se pasa inmediatamente a la columna de cromatografía de captura. En un procedimiento preferido, las dos columnas se desconectan después de la ejecución y se regeneran por separado (limpieza en el lugar). Las etapas de regeneración más preferidas se realizan en flujo inverso.

Etapa de captura

El término "etapa de captura" se entiende como la primera etapa de cromatografía conducida en el modo de unión. La etapa de captura para la purificación de una inmunoglobulina fuera de los fluidos de cultivo se lleva a cabo normalmente como una etapa de cromatografía de afinidad. La Proteína A o sus derivados se usan principalmente como captura de afinidad. Sin embargo, además pueden usarse otros principios cromatográficos como etapas de captura. De acuerdo con la invención, la cromatografía de modo mixto puede usarse con éxito para capturar inmunoglobulinas.

En una realización preferente, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En otra realización preferente, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

(c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En otra realización preferente, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En otra realización preferente la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

5 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

10 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

15 En otra realización preferente, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo;

20 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

25 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En una realización preferente adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

30 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte es $-N(CH_3)_3^+$;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

35 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

Cromatografía de afinidad de Proteína A

40 Al usar una etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A como la etapa de captura después de la etapa de cromatografía de limpieza previa de intercambio iónico, el procedimiento de la invención proporciona un procedimiento rentable de purificación de inmunoglobulina mientras se aprovecha la especificidad de unión significativa de la cromatografía de afinidad de Proteína A en la purificación de inmunoglobulinas.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina" se refiere a cromatografía de afinidad que emplea como ligandos proteínas recombinantes de origen microbiano (por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus magnus*) o variantes derivadas de estas, o péptidos sintéticos que pueden ser de origen microbiano con la capacidad de unirse a inmunoglobulinas. Las proteínas de unión de inmunoglobulina ilustrativas pueden ser Proteína A, Proteína G, Proteína L, o Proteína A/G. Preferentemente, la proteína o péptido de unión a inmunoglobulina es la Proteína A. Los ligandos pueden comprender uno o más de los dominios E, D, A, B y C de la Proteína A. Con mayor preferencia, los ligandos comprenden el dominio B de la Proteína A o la proteína Z modificada por ingeniería genética. Una resina ilustrativa que emplea como ligando un péptido de 14 kD producido recombinantemente con *Saccharomyces cerevisiae* es IgSelect (GE Healthcare). Este ligando para el que no hay información adicional disponible se diseñó específicamente para una alta afinidad con todos los tipos de Fc humano.

Para hacer que el material de cromatografía de afinidad de Proteína A sea más resistente a las duras condiciones de limpieza y para proporcionar protección contra los efectos de contaminación cruzada entre corridas, hoy en día es común usar resinas de afinidad de Proteína A mejoradas, con ligandos especialmente diseñados para garantizar la tolerancia a los álcalis, alta capacidad de unión, y baja pérdida de ligando. Sin embargo, una desventaja importante de estas resinas mejoradas es que son significativamente más costosas que las resinas de Proteína A convencionales. Es una ventaja importante del procedimiento de la presente invención que pueden usarse tanto las resinas de Proteína A convencionales como los productos más recientes de resina de Proteína A de nueva generación. Dado que las resinas de Proteína A se exponen estas a una carga de impurezas más baja, las resinas de Proteína A convencionales y más baratas se vuelven aceptables a pesar de su limitación a condiciones de regeneración bastante suaves. Sin embargo, como un resultado de la etapa de limpieza previa de la invención e independientemente de la resina de Proteína A seleccionada, pueden usarse resinas convencionales y de nueva generación durante una vida útil más larga. Además, debido al hecho de que la limpieza de la columna de Proteína A se hace más fácil, el procedimiento además se vuelve más económico.

Los ejemplos de resinas comunes de Proteína A que pueden usarse para el propósito de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, Unosphere SUPra (Bio-Rad), Proteína A Ceramic HyperD F (Pall Corporation), Poros MabCapture A (Applied Biosystems), ProSep HC, ProSep Ultra y ProSep Ultra Plus (EMD Millipore), Protein A Sepharose FF, rProtein A Sepharose FF, rmp Protein A Sepharose FF, MAbSelect, MAbSelect SuRe, MAbSelect SuRe LX y MabSelect Xtra (GE Healthcare), y Toyopearl rProtein A (Tosoh Bioscience).

Cuando se usa en la presente memoria, el término "Proteína A" abarca la Proteína A recuperada de una fuente nativa de esta, la Proteína A producida sintéticamente o biosintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y sus variantes que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región CH2/CH3. Preferentemente, pueden usarse resinas con alta capacidad de unión y/o estabilidad alcalina. Por ejemplo, puede usarse Proteína A, derivado de Proteína A, medio de afinidad derivado de Proteína A estabilizado con álcali (E. coli). Preferentemente, pueden usarse ligandos derivados de Proteína A (E. coli) estabilizados con álcali. El ligando derivado de Proteína A estabilizado con álcali puede acoplarse a una matriz de agarosa altamente reticulada, preferentemente inmovilizada con un enlace tioéter químicamente estable. Un ejemplo es MabSelect SuRe de GE Healthcare Life Sciences, que puede limpiarse rápida y eficientemente después de la ejecución con hasta NaOH 0,5 M. El ligando estabilizado con álcali de MabSelect SuRe se deriva del dominio B de la Proteína A y esencialmente carece del dominio de unión a VH3 que proporciona un pH de elución más alto. Un producto preferido es MabSelect SuRe LX, que tiene una mayor capacidad de unión que MabSelect SuRe.

Las características de la resina de Proteína A MabSelect SuRe LX son las siguientes:

Matriz	Agarosa rígida, altamente reticulada
Ligando	Estabilizado con álcali, derivado de Proteína A (E. coli)
Acoplamiento de ligando	Adhesión de un solo punto
Acoplamiento de ligando	Epoxy
Tamaño promedio de partícula (d_{50v})*	85 μ m
Capacidad de unión dinámica	Aproximadamente 60 mg de IgG humana/ml de medio a 6 minutos de tiempo de residencia
Velocidad máxima de la fase móvil	500 cm/h
intervalo de pH de trabajo	3-12
Estabilidad química	Estable en todos los tampones acuosos comúnmente usados en la cromatografía de Proteína A
Estabilidad de limpieza en el lugar	NaOH 0,1-0,5 M
Condiciones de entrega	etanol al 20 %

Pueden incluirse uno o varias etapas de lavado entre la cromatografía de afinidad de Proteína A y la elución de la inmunoglobulina de la columna de Proteína A empleando tampón(es) de lavado especiales. El tampón de lavado es el tampón usado para eliminar impurezas de la resina de la Proteína A sin eliminar cantidades significativas de la inmunoglobulina de interés unida a la Proteína A. El tampón de lavado puede comprender sal y detergente (por ejemplo, polisorbato); sal y disolvente (por ejemplo, hexilenglicol); sal de alta concentración (por ejemplo, tampón Tris de alta molaridad); o sal y polímero (por ejemplo, polietilenglicol). Además, el tampón de lavado puede incluir reactivos caotrópicos (por ejemplo, urea o arginina) y/o inhibidores de proteasa (por ejemplo, EDTA).

Para la elución de la inmunoglobulina de interés de la columna de Proteína A, se aplica un tampón de elución. Preferentemente, el tampón de elución tiene un pH bajo y, por lo tanto, interrumpe las interacciones entre la Proteína A y la inmunoglobulina de interés al cambiar la conformación de la proteína. Preferentemente, el tampón de elución de pH bajo tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, con preferencia superlativa en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 4. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen tampones de fosfato, acetato, citrato, glicina, y amonio, así como combinaciones de estos.

Tales tampones preferidos son tampones de citrato y acetato, con preferencia superlativa tampones de citrato de sodio o acetato de sodio. Se contemplan otros tampones de elución, que incluyen tampones de pH alto (por ejemplo, aquellos que tienen un pH de 9 o más) o tampones que comprenden un compuesto o composición tal como $MgCl_2$ (2 mM) para eluir la inmunoglobulina de interés.

- 5 La resina de cromatografía de afinidad de Proteína A puede regenerarse con NaOH de 0,1 a 0,5, preferentemente dentro de la columna (limpieza en el lugar).

En una realización específica, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la
- 15 resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es derivado de Proteína A estabilizado con álcali (por ejemplo, MabSelect SuRe);
- (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la
- 20 resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 25 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico fuerte es $-N(CH_3)_3^+$;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la
- 30 resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali (por ejemplo, MabSelect SuRe);
- (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la
- 35 resina de cromatografía de intercambio catiónico.

Cromatografía de modo mixto como etapa de captura

En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 40 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;
- 45 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

- 50 En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

- 5 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

La cromatografía de modo mixto (MMC) utiliza más de una forma de interacción entre el ligando y las moléculas de la muestra. Las resinas denominadas como resinas de modo mixto son materiales cromatográficos que poseen grupos funcionales que consisten ya sea en ligandos de intercambio iónico hidrofóbicos cargados o minerales cristalinos tales como hidroxiapatita. En lugar de "cromatografía de modo mixto", a veces se ha usado el término "cromatografía multimodal" o "cromatografía de inducción de carga hidrofóbica". La cromatografía de modo mixto es normalmente una interacción de al menos dos principios, la interacción hidrofóbica y el intercambio iónico o la interacción por afinidad metálica y el intercambio iónico. La cromatografía de modo mixto proporciona selectividades menos predecibles que no pueden reproducirse mediante un procedimiento de cromatografía de modo único, tal como el intercambio de iones o la cromatografía de interacción hidrofóbica, respectivamente. Los ligandos hidrofóbicos cargados positivamente pertenecen al grupo de modo mixto de intercambiador iónico (por ejemplo, Capto MMC), y los ligandos cargados negativamente pertenecen al modo mixto de intercambiador catiónico (por ejemplo, CaptoAdhere). Algunas resinas de modo mixto tienen carácter zwitteriónico (por ejemplo, Bakerbond ABx). Otras resinas de modo mixto poseen ligandos hidrofóbicos que son ionizables y se convierten de no cargados a cargados positivamente bajando el pH (por ejemplo, MEP HyperCel). Finalmente, las resinas de hidroxiapatita tienen funciones de modo mixto más complejas al poseer iones de calcio cargados positivamente y grupos fosfato cargados negativamente.

Preferentemente, se emplean resinas de modo mixto que exhiben funcionalidades iónicas e hidrofóbicas, por ejemplo, Bakerbond ABx (JT Baker), Capto MMC, CaptoAdhere (GE Healthcare), PPA HyperCel o MEP Hypercel (Pall Corporation). Con mayor preferencia, se emplea la resina de cromatografía de modo mixto MEP HyperCel.

Las características de la resina de cromatografía de modo mixto MEP HyperCel son las siguientes:

Tamaño de partícula (promedio)	80 - 100 µm
Capacidad de unión dinámica para IgG humana (10 % de retención)	≥20 mg/ml
Ligando	4-Mercapto-Etil-Piridina
Densidad de ligando	80 - 125 µmol/ml
pH de trabajo (a largo plazo)	2 - 12
pH para la limpieza (menos de 6 horas)	2 - 14
Resistencia a la presión	<3 barg (44 psig)
Presión de trabajo típica	<1 barg (14 psig)

La resina de cromatografía de modo mixto que comprende 4-Mercapto-Etil-Piridina como ligando (MEP HyperCel) puede equilibrarse con un tampón que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a 9,9, por ejemplo PBS, pH 7,4 o Tris-HCl 50 mM, pH 8.

30 Para la elución de la inmunoglobulina de interés de la resina de cromatografía de modo mixto que comprende 4-Mercapto-Etil-Piridina como ligando (MEP HyperCel), se aplica un tampón de elución. Preferentemente, el tampón de elución tiene un pH que interrumpe la interacción de la inmunoglobulina de interés y la columna MEP HyperCel. Preferentemente, el tampón de elución tiene un pH en el intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, preferentemente de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 6, con mayor preferencia de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 5,5. Puede añadirse arginina (0,1 a 1,0M, 0,2 a 0,8M, 0,4 a 0,6M) al tampón de elución (tal como los tampones de elución MEP HyperCel) reduciendo así la agregación de inmunoglobulinas y evitando la pérdida de solubilidad a pH ácido.

Una ventaja de la cromatografía de modo mixto es que la unión de la inmunoglobulina a la resina no requiere la adición de grandes cantidades de sal (tal como el sulfato de amonio) como es, por ejemplo, cuando se usa la cromatografía de interacción hidrofóbica convencional.

La condición de elución suave de la cromatografía de modo mixto (tal como la cromatografía de modo mixto que emplea una resina que comprende 4-Mercapto-Etil-Piridina como ligando) puede reducir la agregación y puede preservar la actividad biológica de la inmunoglobulina.

45 La resina de cromatografía de modo mixto puede regenerarse con ácido cítrico 10 a 200 mM, HCl 10 mM, NaOH 0,5 a 1,0 M, clorhidrato de guanidina 6 M, urea 2 a 8 M o propanol al 40 %. Preferentemente, al aplicar la etapa de limpieza previa, la resina de cromatografía de modo mixto puede regenerarse simplemente con ácido cítrico 100 mM seguido de NaOH 0,5 a 1,0M.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 5 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando es 4-Mercapto-Etil-Piridina;
- 10 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 15 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando es 4-Mercapto-Etil-Piridina;
- 20 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

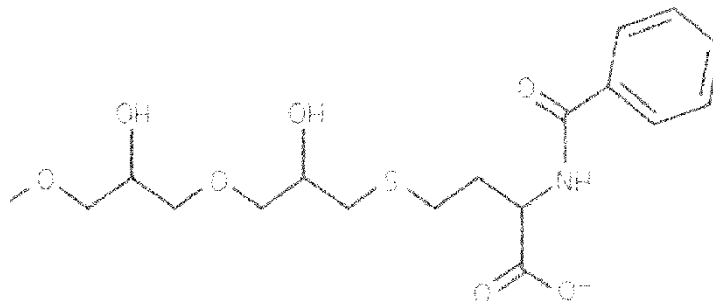
25 En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo; en el que el ligando es $-N(CH_3)_3^+$;
- 30 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando es 4-Mercapto-Etil-Piridina;
- (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.
- 35

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 40 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;
- (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;
- 45 (b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;
- (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía intercambio catiónico.
- 50

Preferentemente, para la cromatografía de modo mixto de la etapa (b), puede usarse una resina de cromatografía de modo mixto que comprende ligandos cargados negativamente. Con mayor preferencia, la resina que comprende ligandos cargados negativamente es un intercambiador catiónico débil multimodal (Capto MMC) con la siguiente fórmula



5

Las características del intercambiador catiónico débil multimodal Capto MMC son las siguientes:

Capacidad iónica	0,07-0,09 mmol H+/ml de medio
Estabilidad química	Todos los tampones acuosos comúnmente usados, Ácido acético 1 M, hidróxido sodio 1 M, urea 8 M, clorhidrato de guanidina 6 M, y etanol al 70 % 1)
Condiciones de almacenamiento	4 a 30 °C, etanol al 20 %
Estabilidad de pH de trabajo	2-12
Intervalo	
Matriz	Agarosa altamente reticulada
Estabilidad del pH de Limpieza en el lugar (CIP)	2-14
Tipo de intercambiador iónico	Intercambiador catiónico débil multimodal
Capacidad de unión/ml	> 45 mg de BSA/ml de medio a 30
Medio de cromatografía	mS/cm2)

10 Para la elución de la inmunoglobulina de interés de la resina de cromatografía de intercambio catiónico débil multimodal, puede aumentarse el pH y/o la concentración de sal del tampón. Preferentemente, tanto el pH como la concentración de sal pueden aumentarse. La concentración de sal del tampón de elución puede variar de 0,25M a 1,75M, preferentemente de 0,5M a 1M. Las sales/tampones ilustrativos usados para la elución pueden ser fosfato de sodio, Tris-HCl, NaCl y/o NH₄Cl. La fuerza iónica puede variar de 0,02 - 0,3M. El pH del tampón puede variar entre pH 6 y pH 9, preferentemente entre pH 7 y 8, con mayor preferencia se aplica una etapa de lavado adicional con pH entre 5,5 y 7,5 antes de la elución.

15 En una realización alternativa, puede emplearse una etapa de pulido adicional. La etapa de pulido adicional puede ser de cualquier procedimiento de cromatografía adecuado para una etapa de pulido tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de modo mixto.

20 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

25 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que los ligandos de la resina de cromatografía de modo mixto se cargan negativamente;

(b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía intercambio catiónico.

5 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

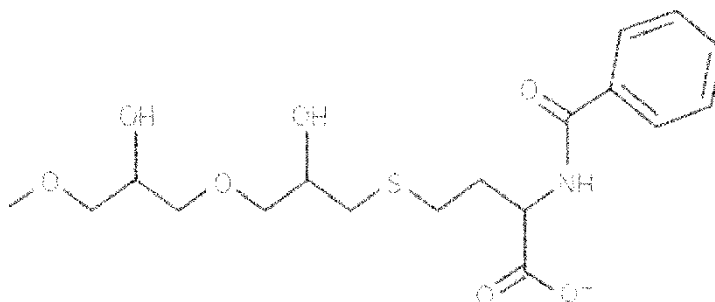
(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

10 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

15 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a la cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

20 en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto de la etapa (b) tiene la siguiente fórmula



Cromatografía de intercambio catiónico como etapa de pulido

25 La cromatografía de intercambio catiónico se basa en las interacciones carga-carga entre las proteínas de la muestra y las cargas inmovilizadas en la resina. En la cromatografía de intercambio catiónico, las moléculas que se unen se cargan positivamente y los grupos funcionales inmovilizados (ligandos) se cargan negativamente. Las resinas de intercambio catiónico comúnmente usadas son las resinas S, (sulfonato), resinas SP (sulfopropilo), resinas SE (sulfoetilo), y resinas CM (carboximetilo).

30 Sin embargo, generalmente, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse con todas las resinas o membranas comunes de intercambio catiónico disponibles en el comercio. Las resinas de intercambio catiónico pueden usarse en forma de columnas o membranas preempaquetadas en las que se fija el grupo funcional, por ejemplo, ácido sulfónico. Alternativamente, las resinas pueden comprarse como material a granel y las columnas empaquetadas por el usuario. No existen limitaciones específicas en cuanto a la capacidad y la dimensión de las columnas que no sean las habituales. El experto en la técnica conoce la cantidad de resina de intercambio catiónico y el tamaño de la columna que se usa. Esto depende de la escala general del procedimiento.

35 Los productos típicos disponibles en el comercio incluyen, por ejemplo, Macro-Prep High S, Macro-Prep CM, Unosphere Rapid S, Unosphere Rapid S40, Nuvia S y Nuvia HR-S (Bio-Rad, California, Estados Unidos), Toyopearl CM, Toyopearl SP, y Toyopearl GigaCap S (Tosoh Bioscience, Alemania), Millipore ProRes S, Fractogel EMD COO-, Fractogel EMD SO3- (Merck KGaA, Alemania), Biosepra CM Ceramic HyperD, Biosepra S Ceramic HyperD, S HyperCel (Pall Corporation, Nueva York, Estados Unidos), Poros HS, Poros XS (Applied Biosystems, Alemania), YMC BioPro 30S, YMC BioPro 70S (YMC Europa) CM-Sepharose FF, SP-Sepharose FF, S-Sepharose FF, SP-Sepharose HP, SP-Sepharose XL, SP-Sepharose Big Beads, CM-Sephadex, Capto S, Capto SP ImpRes, y Source S (todos GE Healthcare, Alemania). Comúnmente, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza con el uso de tampones a valores de pH entre 4 y 7.

45 Las resinas de intercambio catiónico preferentes de la presente invención son intercambiadores catiónicos fuertes que usan ligandos sulfonato o sulfopropilo. Los más preferidos son los ligandos de sulfonato o sulfopropilo unidos a

matrices rígidas tales como agarosa altamente reticulada, por ejemplo, Nuvia HR-S, o poli(estirenovinilbenceno), por ejemplo, Poros 50 HS.

Las características del intercambiador catiónico Poros 50 HS son las siguientes:

Matriz de soporte	Poli(estirenodivinilbenceno) reticulado
Funcionalidad de la superficie	Sulfopropil(-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻)
Capacidad de unión dinámica @1.000 cm/h	Lisozima, pH 6,2 55 mg/ml
Contracción/hinchazón	<1 % de 0-100 % de disolvente
Tamaño de partícula	50 µm
Velocidad de flujo máximo recomendado en longitud de lecho de 10 cm	1,000 cm/h
Resistencia mecánica	100 bar (1500 psi, 10 MPa)
Contrapresión de medios	<3 bar a 1,000 cm/h (altura de lecho de 10 cm)

5 Un material preferido alternativo a Poros 50 HS es Nuvia HR-S, un intercambiador catiónico fuerte en base a grupos sulfonato y una matriz de agarosa altamente reticulada.

La cromatografía de intercambio catiónico puede equilibrarse con un tampón que tiene un pH de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 8. La concentración de tampón puede estar en el intervalo de 10 mM a 100 mM, preferentemente en el intervalo de 20 mM a 50 mM.

10 Ejemplos de tampones usados para la cromatografía de intercambio catiónico son ácido cítrico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido butanodioico, ácido acético, ácido malónico, glicina, MES, fosfato, HEPES, o mezclas de estos.

La etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede separar las variantes de carga de la inmunoglobulina y puede eliminar las proteínas residuales de la célula huésped, los agregados y la Proteína A lixiviada.

La inmunoglobulina puede unirse a la resina a un valor de pH más abajo del punto isoeléctrico (pI) de la inmunoglobulina y a baja conductividad.

15 Para la elución, puede usarse un aumento en la fuerza iónica del tampón de elución, proporcionado ya sea por una sola etapa o un gradiente. Las sales ilustrativas usadas en la elución de la cromatografía de intercambio catiónico son NaCl, KCl, sales de sulfato, sales de fosfato, sales de formiato, o sales de acetato. Preferentemente, se usan NaCl o KCl. La fuerza iónica puede aumentarse hasta 1M.

20 Alternativamente, puede usarse un aumento en el pH del tampón de elución, proporcionado ya sea por una sola etapa o un gradiente.

Una realización preferente para la realización de la cromatografía de intercambio catiónico es un intervalo de trabajo de pH entre 4 y 6, con mayor preferencia un intervalo de pH entre 4,5 y 5,5. Pueden usarse ácidos carbónicos como sustancias tampón, siendo el ácido cítrico el más preferido.

25 En una realización preferente adicional, la elución de inmunoglobulina unida a la resina de intercambio catiónico se realiza mediante un cambio en el valor de pH, es decir, un aumento en el pH. Esto puede lograrse mediante un gradiente de pH bajo a pH alto proporcionado mediante la mezcla de dos soluciones tampón diferentes. Son preferentes los tampones de citrato para el pH bajo y los tampones de fosfato para el pH alto. En la máxima realización preferente, el gradiente de pH se forma mezclando un tampón citrato de aproximadamente pH 5 a 6 con un tampón fosfato de aproximadamente pH 7 a 9. Los tampones pueden prepararse con el uso de las sales de Na de los ácidos a una concentración de 10 a 50 mM.

30 Alternativamente, puede usarse un aumento tanto en el pH como en la fuerza iónica del tampón de elución para la elución, proporcionado por una sola etapa o un gradiente.

35 La resina de cromatografía de intercambio catiónico puede regenerarse con NaCl 1M durante 3 a 5 volúmenes de columna. Además, puede aplicarse un procedimiento de limpieza en el lugar que comprende las siguientes etapas: (a) lavar con 1 a 5 volúmenes de columna de NaOH 1M, NaCl 1M, (b) lavar con 1 a 5 volúmenes de columna de ácido acético 1M o TFA, (c) reequilibrar.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

5 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

10 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo.

15 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo;

20 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

25 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

30 (a) exponer la muestra a la cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte es $-N(CH_3)_3^+$;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

35 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo.

40 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

45 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico fuerte y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte, en el flujo continuo, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio iónico fuerte es $-N(CH_3)_3^+$;

50 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a la cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali (por ejemplo, MabSelect SuRe);

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la

resina de cromatografía de intercambio catiónico, en el que el ligando de la resina de cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo.

5 En otra realización, la etapa de limpieza previa de la invención se sigue por una cromatografía de modo mixto que se lleva a cabo en el modo de unión, seguida por una cromatografía de afinidad de proteína/péptido que se lleva a cabo en el modo de unión.

En otra realización, la etapa de limpieza previa de la invención se sigue por una cromatografía de modo mixto que se lleva a cabo en el modo de unión, seguida por una cromatografía de afinidad de Proteína A que se lleva a cabo en el modo de unión.

10 Los detalles sobre la cromatografía de afinidad de Proteína A se proporcionan anteriormente y además se aplican a la cromatografía de Proteína A que sigue a la cromatografía de modo mixto.

Los detalles sobre la cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina se proporcionan anteriormente y además se aplican a la cromatografía de afinidad de Proteína A que sigue a la cromatografía de modo mixto.

Cromatografía de modo mixto como etapa de pulido adicional

15 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

20 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

25 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

30 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

35 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

40 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

45 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

50 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

5 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

10 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

15 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

20 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

25 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

30 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

35 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

40 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

45 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

50

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

5 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

15 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

20 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

25 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

30 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

35 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

40 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es $-N(CH_3)_3^+$;

45 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

50 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

(d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

5 En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es $-N(CH_3)_3^+$;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

15 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

20 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

25 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

30 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

35 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

40 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

45 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

50 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

(c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la

inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

- 5 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es $-N(CH_3)_3^+$;

- 15 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

- 20 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

(d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

- 25 En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 30 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es $-N(CH_3)_3^+$;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

- 35 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

- 40 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 45 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

- 50 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la

resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

- 5 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

- 15 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

- 20 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es un intercambiador iónico fuerte multimodal.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 25 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

- 30 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

- 35 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

- 40 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

- 45 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

- 50 (b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

5 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo.

En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

10 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando es 4-mercapto-etil-piridina;

15 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

20 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto.

En una realización adicional la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

25 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

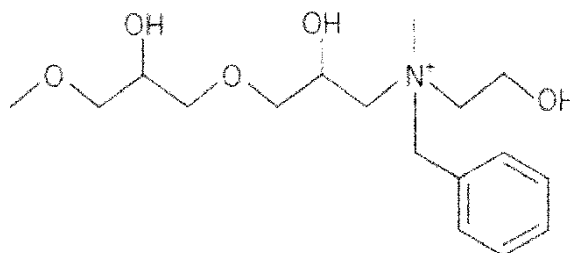
(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando es 4-Mercapto-Etil-Piridina;

30 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

35 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo.

Los medios denominados como medios o resinas de modo mixto son medios cromatográficos que poseen grupos funcionales que consisten en ligandos de intercambio iónico hidrofóbicos cargados o minerales cristalinos tales como hidroxiapatita. En lugar de "cromatografía de modo mixto", a veces se ha usado el término "cromatografía multimodal" o "cromatografía de inducción de carga hidrofóbica". La cromatografía de modo mixto es una interacción de al menos dos principios, interacción hidrofóbica y el intercambio iónico o la interacción por afinidad metálica y el intercambio iónico. La cromatografía de modo mixto proporciona selectividades menos predecibles que no pueden reproducirse mediante un procedimiento de cromatografía de modo único, tal como el intercambio de iones o la cromatografía de interacción hidrofóbica, respectivamente. Los ligandos hidrofóbicos cargados positivamente pertenecen al grupo de modo mixto de intercambiador iónico (por ejemplo, Capto MMC), y los ligandos cargados negativamente pertenecen al modo mixto de intercambiador catiónico (por ejemplo, CaptoAdhere). Algunos medios de modo mixto tienen carácter zwitteriónico (por ejemplo, Bakerbond ABx). Otros medios de modo mixto poseen ligandos hidrofóbicos que son ionizables y se convierten de no cargados a cargados positivamente bajando el pH (por ejemplo, MEP HyperCel). Finalmente, los medios de hidroxiapatita tienen funciones de modo mixto más complejas al poseer iones de calcio cargados positivamente y grupos fosfato cargados negativamente.

50 Preferentemente, la etapa de cromatografía de modo mixto que sigue a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un medio que comprende ligandos cargados positivamente. Con mayor preferencia, el ligando cargado positivamente es N-bencil-N-metil etanol amina con la siguiente fórmula:



(por ejemplo, CaptoAdhere de GE Healthcare, Alemania).

Las características de la resina de cromatografía de modo mixto CaptoAdhere son las siguientes:

Matriz	agarosa altamente reticulada
Grupo funcional	intercambiador iónico fuerte multimodal
Capacidad iónica total	0,09 - 0,12 mmol Cl-/ml de medio
Tamaño de partícula	75 µm (d50v)
Velocidad de flujo	al menos 600 cm/h en una columna de 1 m de diámetro con una altura de lecho de 20 cm a 20 °C con el uso de tampones de procedimiento con la misma viscosidad que el agua a < 3 bar (0,3 MPa)
estabilidad del pH	
- a corto plazo	2 - 14
- a largo plazo	3 - 12
Temperatura de trabajo	4 a 30 °C
Estabilidad química	todos los tampones acuosos comúnmente usados, ácido acético 1 M, hidróxido de sodio 1 M
Evitar	agentes oxidantes, detergentes aniónicos

5 Pueden aplicarse las siguientes condiciones al cargar la resina de cromatografía de modo mixto CaptoAdhere en el modo de elución y unión: pH 6 a pH 9, preferentemente pH 7,0 a 8,5; conductividad 0,5 a 10 mS/cm, preferentemente 1 a 4 mS/cm. Pueden usarse una o más etapas de lavado. Las condiciones dependen del pI de la inmunoglobulina.

10 Las condiciones de carga preferidas para la cromatografía CaptoAdhere pueden ser las siguientes: La resina se equilibra con fosfato de Na 0,5M, pH 8,2 seguido de fosfato de Na 20 mM, pH 8,2. La muestra (grupo de intercambio catiónico) se ajusta a pH 8,0-8,5 y una conductividad de 1-4 mS/cm y se carga en la columna. Después de lavar con el tampón de equilibrio fosfato de Na 20 mM, pH 8,2 la inmunoglobulina de interés puede eluirse de la resina CaptoAdhere, por ejemplo con fosfato de Na 20 mM, pH 5 a 7, preferentemente pH 5,5 a 6,5.

15 En el modo de flujo continuo, el pH y la fuerza iónica deben ajustarse de tal manera que la inmunoglobulina no se una al ligando de modo mixto mientras que se eliminan los contaminantes residuales (ADN, agregados, Proteína A lixiviada proteínas de la célula huésped) que permanecen unidos. Las condiciones dependen del pI de la inmunoglobulina. Preferentemente, los tampones fosfato o Tris se usan en un intervalo de pH de 6,5 a 8,5, con mayor preferencia entre pH 7 y 8. La conductividad se ajusta con sal, tal como NaCl o por la concentración del tampón. Lo más preferido es un tampón de fosfato de Na en el intervalo de concentración de 10 a 50 mM suplementado con NaCl en el intervalo de concentración de 50 a 200 mM. Debe considerarse que las altas concentraciones de sal, aunque desorben la interacción iónica, promueven la interacción hidrofóbica. En un procedimiento preferido, el eluato de la cromatografía de intercambio catiónico se ajusta a pH 7,5 a 8 y la conductividad se elevó con NaCl para ser 10-12 mS/cm.

20 La regeneración (limpieza en el lugar) para la resina de modo mixto puede realizarse con pH bajo, sal alta y pH alto, por ejemplo, con ácido cítrico 10 a 200 mM, NaCl 0,5-2M y NaOH de 10 mM a 1M.

25 El procedimiento de regeneración preferido se realiza lavando consecutivamente con soluciones A-D: Solución A: Ácido cítrico 100 mM, NaCl 2M; Solución B: NaCl 2M; Solución C: NaOH 1M; Solución D: NaOH 10 mM. El almacenamiento de la resina se puede realizar en la Solución D.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

30 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es - N(CH₃)₃⁺;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

5 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

10 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es N-bencil-N-metil etanol amina.

15 En una realización adicional la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio iónico es $-N(CH_3)_3^+$;

20 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

25 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

30 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es N-bencil-N-metil etanol amina.

35 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

40 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A; en el que el ligando de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A es un derivado de Proteína A estabilizado con álcali;

45 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

50 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es N-bencil-N-metil etanol amina.

En una realización adicional la divulgación proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une al medio de intercambio iónico, en el flujo continuo;

5 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de proteína/péptido de unión a inmunoglobulina;

10 (c) exponer el eluato obtenido en la etapa (b), o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico; en el que el ligando de la cromatografía de intercambio catiónico es sulfopropilo;

15 (d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto; en el que el ligando de la resina de cromatografía de modo mixto es N-bencil-N-metil etanol amina.

Como etapa de pulido, además pueden emplearse otros tipos de cromatografía. Por ejemplo, la cromatografía en columna de intercambio iónico y la cromatografía en membrana de intercambio iónico pueden emplearse como etapa de pulido, siendo el modo de flujo continuo el más preferido.

20 El punto isoeléctrico o pI de una proteína se refiere al pH al que la proteína tiene una carga total neta igual a cero, es decir, el pH al que la proteína tiene el mismo número de cargas positivas y negativas. La determinación del pI puede realizarse de acuerdo con técnicas establecidas en la técnica anterior, tales como el enfoque isoeléctrico.

En una realización adicional, la purificación puede incluir uno o más etapas de centrifugación que preceden a la primera etapa de cromatografía.

25 En otra realización, la purificación puede incluir uno o más etapas de filtración que preceden a la primera etapa de cromatografía. En una realización preferente adicional, la purificación puede incluir una etapa de centrifugación y una o más etapas de filtración. En una realización preferente, la primera etapa de cromatografía se precede por una filtración de profundidad y una etapa de microfiltración. En una realización preferente mayor la primera etapa de cromatografía se precede por una etapa de separación celular, una etapa de filtración profunda y una etapa de microfiltración.

30 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) centrifugar la muestra, en la que la inmunoglobulina se obtiene en el sobrenadante;

35 (ii) filtrar en profundidad el sobrenadante obtenido en la etapa (i), en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

(iii) microfiltrar la inmunoglobulina obtenida en la etapa (ii); en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

(a) exponer el filtrado de la etapa (iii) a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

40 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

45 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico.

50 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) centrifugar la muestra, en la que la inmunoglobulina se obtiene en el sobrenadante;

(ii) filtrar en profundidad el sobrenadante obtenido en la etapa (i), en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

(iii) microfiltrar la inmunoglobulina obtenida en la etapa (ii); en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

5 (a) exponer el filtrado de la etapa (iii) a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

10 (b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

15 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía intercambio catiónico.

(d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

20 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) centrifugar la muestra, en la que la inmunoglobulina se obtiene en el sobrenadante;

(ii) filtrar en profundidad el sobrenadante obtenido en la etapa (i), en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

25 (iii) microfiltrar la inmunoglobulina obtenida en la etapa (ii); en la que la inmunoglobulina se obtiene en el filtrado;

(a) exponer el filtrado de la etapa (iii) a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

30 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de modo mixto, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto

(b2) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (b) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

35 (c) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b2), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía intercambio catiónico.

(d) exponer el eluato obtenido en la etapa (c) a cromatografía de modo mixto y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de modo mixto, en el flujo continuo.

40 **Filtración de profundidad**

Además, el procedimiento de la invención puede comprender uno o más etapas de filtración de profundidad. A diferencia de los filtros de membrana que se separan reteniendo las partículas en la superficie de una membrana, los filtros de profundidad consisten en una matriz de fibras o perlas, en la que la separación tiene lugar en toda la matriz en lugar de en su superficie.

45 Los ejemplos de filtros de profundidad incluyen, pero no se limitan a, cápsulas de filtro SXLP700416 y SXLPDE2408SP (Pall Corporation), filtros Millistak+ XOHC, FOHC, DOHC, AIHC, y BIHC Pod (EMD Millipore) o Zeta 20 Plus 30ZA/60ZA, 60ZN90ZA, delipid, VR07, y VR05 (3M).

Preferentemente, el filtro de profundidad se compone de un filtro inorgánico previamente extraído, celulosa y un sistema de resina que imparte una fuerte carga positiva a la matriz del filtro, como por ejemplo Zeta Plus de 3M, Reino Unido.

50

Los filtros de profundidad de máxima preferencia usados para la presente invención son las cápsulas de filtro de las series PDE2 y P700 de Pall Corporation.

Ultrafiltración, Filtración de virus, Microfiltración

5 Además, el procedimiento de la invención puede comprender uno o más etapas de microfiltración, ultrafiltración y/o nanofiltración. La ultrafiltración es una forma de filtración por membrana en la que la presión hidrostática fuerza a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos y solutos en suspensión de alto peso molecular se mantienen, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. La ultrafiltración es un procedimiento comúnmente usado para separar, purificar y concentrar soluciones macromoleculares, especialmente soluciones de proteínas. La ultrafiltración puede combinarse con la diafiltración. Este modo es adecuado para el intercambio de tampones, para eliminar sales y otras microespecies de la solución mediante dilución y reconcentración repetidas o continuas. La ultrafiltración puede realizarse con membranas apiladas en un sistema de filtración de flujo tangencial o flujo cruzado (TFF o TF-UF), especialmente para procesar grandes volúmenes de muestra. Alternativamente, los sistemas de fibra hueca se usan comúnmente para la ultrafiltración. Los tamaños de corte de membrana varían de aproximadamente 1 a 300kD. Para las inmunoglobulinas, los cortes típicos para las membranas de ultrafiltración son 10-100kD. En el marco de la presente invención, se prefiere un corte de peso molecular de 30 o 50 kD para las membranas de UF.

La microfiltración es un procedimiento de filtración de partículas que usa membranas con tamaños de poro de aproximadamente 0,1 a 10 μ m. Para la filtración estéril, que establece requisitos especiales para el medio ambiente, se usan microfiltros esterilizados con tamaños de poro de aproximadamente 0,2 μ m. El uso de prefiltros adicionales con tamaños de poro más grandes (0,45 μ m, 3 μ m) es común. Esto evita la disminución del flujo mediante el bloqueo rápido de los filtros de tamaño de poro pequeño.

Finalmente, en la producción biofarmacéutica, la nanofiltración se usa predominantemente para la filtración viral y se requiere para la seguridad de las proteínas terapéuticas producidas en cultivos de células de mamíferos. Las etapas de nanofiltración normalmente se realizan al final del flujo cerca del llenado de la mayor parte de la inmunoglobulina purificada. Los tamaños de poro de los nanofiltros usados frecuentemente varían entre 15 y 35 nm (Planova, Asahi Kasei, Japón; o Viresolve, EMD-Millipore, Alemania).

En una realización preferente de la invención, el procedimiento de purificación comprende uno o más etapas de ultrafiltración/diafiltración y/o nanofiltración. Estas etapas de filtración pueden realizarse con el uso de dispositivos de filtración disponibles en el comercio, por ejemplo, disponibles de Pall Corporation, GE Healthcare, EMD-Millipore o Sartorius.

En otra realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de incubación del eluato de la cromatografía de afinidad de Proteína A a pH bajo de 2,5 a 4,5, preferentemente pH de 3 a 4, durante un tiempo definido, preferentemente de 30 a 90 min.

En otra realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de incubación del eluato de la cromatografía de modo mixto a pH bajo de 2,5 a 4,5, preferentemente pH de 3 a 4, durante un tiempo definido, preferentemente de 30 a 90 min.

En una realización adicional, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de exponer el eluato obtenido de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, o una composición derivada de esta y obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico a nanofiltración.

Preferentemente, pueden aplicarse filtros con tamaños de poro de 15 a 35 nm, con máxima preferencia 20 nm, para la nanofiltración.

La etapa de cromatografía de intercambio iónico en el modo de flujo continuo puede resultar en un factor de reducción log₁₀ de al menos 5, de al menos 5,5, de al menos 6, de al menos 6,5 con respecto a los virus.

45 La etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo puede resultar en un factor de reducción log₁₀ de al menos 5, preferentemente de al menos 5,5 con respecto a los virus envueltos.

La etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede resultar en un factor de reducción log₁₀ de al menos 5 con respecto a los virus envueltos.

50 La etapa de nanofiltración puede resultar en un factor de reducción log₁₀ de al menos 4 para virus envueltos y/o en un factor de reducción log₁₀ de al menos 5 para virus no envueltos.

La etapa de cromatografía de intercambio catiónico y la etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo puede resultar en un factor de reducción log₁₀ de al menos 10 con respecto a los virus envueltos.

En una realización de la invención, la etapa de cromatografía de intercambio iónico y la etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo puede resultar en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de al menos 10, preferentemente de al menos 11, con mayor preferencia de al menos 12 con respecto a los virus envueltos.

5 En otra realización de la invención, la etapa de cromatografía de intercambio iónico, la etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo y la etapa de nanofiltración puede resultar en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de al menos 15, preferentemente de al menos 16 con respecto a los virus envueltos.

10 En otra realización de la invención, la etapa de cromatografía de intercambio iónico, la etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo y la etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede resultar en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de al menos 15, preferentemente de al menos 16, con mayor preferencia de al menos 17 con respecto a los virus envueltos.

15 En otra realización de la invención, la etapa de cromatografía de intercambio iónico, la etapa de incubación del eluato (obtenido de la etapa de cromatografía de afinidad de Proteína A o etapa de cromatografía de modo mixto) a pH bajo, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico y la etapa de nanofiltración pueden resultar en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de al menos 20, preferentemente de al menos 21 con respecto a los virus envueltos.

La etapa de cromatografía de intercambio iónico, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico y la etapa de nanofiltración pueden resultar en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de al menos 12, preferentemente de al menos 13 con respecto a virus no envueltos.

20 La invención se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

25 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

30 en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (c) de al menos 10 con respecto a los virus envueltos,

en la que la muestra es fluido de cultivo cosechado, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado.

35 Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

40 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

(d) exponer el eluato después de la incubación de la etapa (c), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c), a nanofiltración;

45 en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (d) de al menos 10 con respecto a virus no envueltos y/o en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de las etapas, (a), (c) y (d) de al menos 15 con respecto a virus no envueltos y/o virus envueltos.

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

50 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

5 (c2) exponer el eluato obtenido en la etapa (c), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

10 en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c) y (c2) de al menos 15 con respecto a los virus envueltos.

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento que comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

15 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

(b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) a cromatografía de afinidad de Proteína A, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

20 (c2) exponer el eluato obtenido en la etapa (c), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

25 (d) exponer el eluato después de la incubación de la etapa (c2), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c2), a nanofiltración;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción de \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c) y (c2) de al menos 15 con respecto a los virus envueltos y/o en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c), (c2) y (d) de al menos 20 con respecto a los virus envueltos y/o en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c2) y (d) de al menos 12 con respecto a los virus no envueltos.

30 Una realización adicional se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden: (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

35 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

40 y exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a nanofiltración;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas a) y d) de al menos 10 con respecto a virus envueltos y/o virus no envueltos.

45 Una realización adicional se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden: (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no se une a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

50 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(c2) exponer la composición obtenida después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (b), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina se une a la resina de cromatografía de intercambio catiónico, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

- 5 y exponer el eluato obtenido en la etapa (c2), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c2), a nano filtración;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas a), c2) y d) de al menos 15 con respecto a los virus envueltos y/o en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de las etapas, (a), (c2) y (d) de al menos 13 con respecto a los virus no envueltos.

- 10 Los procedimientos descritos anteriormente además sirven para aumentar la seguridad viral en un procedimiento de fabricación de una inmunoglobulina.

El término incubación "durante un tiempo definido" como se refiere en la presente memoria se refiere a incubación durante al menos 30 minutos, durante al menos 40 minutos durante al menos 50 minutos y al menos 60 minutos, preferentemente a incubación durante 30 minutos a 90 minutos, con mayor preferencia durante 45 minutos a 75 minutos, con máxima preferencia durante 60 minutos.

- 15

El pH de la etapa "incubación a un pH bajo" se refiere no solo a pH de 2,5 a 4,5, sino que además se refiere a un pH de 3 a 4, preferentemente de 3,25 a 3,75 con mayor preferencia a pH de 3,5.

El término "virus envuelto" se refiere a cualquiera de los virus con una envoltura de lipoproteína que rodea el núcleo de nucleoproteína del virus, por ejemplo, a Herpesvirus, Citovirus, Poxvirus, Arenavirus, Arterivirus, Hepadnavirus, Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Ortomixovirus, Paramixovirus, Rabdovirus, Buniavirus, Filovirus, Baculovirus, Iridovirus, y Retrovirus, que incluyen los patógenos humanos y el virus modelo Virus de la Leucemia Murina (MuLV) que se usó en los experimentos.

- 20

El término "virus no envueltos" se refiere a cualquiera de los virus que carecen de la envoltura viral, por ejemplo a, Adenovirus, Caulimovirus, Miovirus, Ficodnavirus, Tectivirus, Papovavirus, Circovirus, Parvovirus, Birnavirus, Reovirus, Astrovirus, Calcivirus, Picomavirus, Potivirus, Tobamavirus, Carlavirus, Anellovirus, y Hepevirus, que incluyen los patógenos humanos y el virus modelo Virus Diminuto de Ratón (MVM), que se usó en los experimentos.

- 25

La relación calculada del título viral en el material de partida y en la fracción de producto relevante define la reducción viral, denominada factor de reducción \log_{10} (LRF), valor de reducción \log_{10} (LRV), o a veces simplemente aclaramiento \log_{10} . El modo de cálculo del LRF se describe en las pautas relevantes para los estudios de aclaramiento viral (por ejemplo (Appendix II of EMA guideline CPMP/BWP/268/95 (1996) "Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses").

- 30

$$\text{Factor de reducción Log}_{10} = \frac{\text{Concentración viral en la carga de la muestra (enriquecida)}}{\text{Concentración viral en la fracción producto(después de la etapa)}}$$

La "etapa de lavado" es una etapa realizada después de que la muestra se carga en la columna de cromatografía, pero antes de que la proteína se eluya de la columna. La etapa de lavado elimina adicionalmente los contaminantes unidos de manera menos apretada o inespecífica a la matriz, a la inmunoglobulina y/o al ligando, sin eluir significativamente la inmunoglobulina de interés de la resina. En la etapa de lavado, la resina se lava con el tampón de lavado deseado (por ejemplo, el tampón de lavado se pasa a través de la columna de cromatografía hasta que la absorción de UV medida en la salida de la columna vuelve a los valores iniciales).

- 35

El término "elución" se entiende como un procedimiento que desorbe una inmunoglobulina de interés de una resina de cromatografía al alterar las condiciones de la solución de modo que los componentes del tampón compitan con la molécula de interés por el sitio del ligando en la resina de cromatografía. Otro modo de elución ocurre en la cromatografía de afinidad, por ejemplo, usando la Proteína A. En este caso, el tampón de elución puede alterar la conformación del ligando o la inmunoglobulina, aflojando de ese modo la unión. Una inmunoglobulina de interés puede eluirse de las resinas de intercambio iónico al alterar la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico de modo que los iones tampón en la fase móvil compitan con la molécula por los sitios iónicos cargados de la resina de intercambio iónico. Alternativamente, un cambio en el pH influye en la proteína anfótera y un aumento de pH por encima del pI de la proteína impide en adelante su unión a una resina de intercambio catiónico y la proteína eluye. El mismo efecto se produce en una resina de cromatografía de intercambio iónico cuando el pH disminuye por debajo del pI de la proteína.

- 40
- 45

Como se entiende en la presente memoria, el término "elución" comprende elución isocrática, elución en una sola etapa, y elución en gradiente, con o sin etapas de lavado anteriores. La elución de la inmunoglobulina de interés puede realizarse aumentando la fuerza iónica o la conductividad en la fase móvil, que se afecta por el aumento de la

- 50

concentración de sal en la solución tampón. Alternativamente, un aumento o disminución en el valor de pH puede ser adecuado. Pueden emplearse gradientes escalonados discontinuos, gradientes lineales, gradientes no lineales o una combinación adecuada de tales gradientes.

5 Los tampones adecuados para el lavado y la elución pueden seleccionarse entre acetato, citrato, Tris/HCl, Tris/acetato, fosfato, succinato, malonato, MES, HEPES, Bistris, glicina, y otros tampones adecuados con la adición de sales tales como fosfatos, sulfatos, o cloruros, tales como NaCl o KCl. La fuerza iónica y la concentración de sal, por medio de las cuales se logra la elución, dependen del valor de pH de la solución tampón y del pI de la proteína. El tampón de lavado puede comprender además detergente (por ejemplo, polisorbato), disolvente (por ejemplo, hexilenglicol, isopropanol, o etanol) o polímero (por ejemplo, polietilenglicol). Además, el tampón de lavado puede incluir reactivos caotrópicos (por ejemplo, urea o arginina) y/o inhibidores de proteasa (por ejemplo, EDTA).

Como se usa en la presente memoria el término "tampón" se refiere a una solución que resiste los cambios en el pH mediante la acción de los componentes del conjugado ácido-base.

15 Los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" se usan indistintamente en la presente memoria. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y sus fragmentos que exhiben la actividad de unión al antígeno deseada. Anticuerpos de origen natural son moléculas con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se enlazan por puentes disulfuro. De N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), denominado además un dominio variable pesado o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y opcionalmente CH4). Del mismo modo, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL), denominado además un dominio variable ligero o un dominio variable de cadena ligera, seguido por un dominio constante de cadena ligera (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se le puede asignar uno de los dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

25 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o la variable de éste. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; moléculas de anticuerpo de cadena única; diacuerpos; anticuerpos lineales; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

30 Preferentemente la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen diferentes anticuerpos, dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular.

La inmunoglobulina puede ser de la clase murina IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, IgA, IgD o IgE, las clases humanas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE, o combinaciones o fragmentos de estas.

40 La inmunoglobulina puede reconocer cualquiera o una combinación de proteínas, que incluyen, pero no se limitan a los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, CD152, IL-1a, IL-1 β , IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-12, receptor de IL-13, subunidades de receptor de IL-18, PDGF- β , y análogos de estos, PLGF, VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF-p1, receptor de EGF, receptor de PLGF, receptor de VEGF, receptor de plaquetas gpIIb/IIIa, receptor de trombopoyetina, receptor de apoptosis PD-1, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos B BlyS, regulador de activación de células T CTLA-4, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, ErbB2/HER-2, epítomos asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en el suero de pacientes, epítomos asociados a cáncer o proteínas expresadas en mama, colon, células escamosas, células de cáncer de próstata, pancreático, pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, integrina α 4 β 1 y α 4 β 7, receptores TRAIL 1,2,3 y 4, RANK, ligando RANK (RANKL), TNF- α , molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), adhesina de leucointegrina, glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, esclerostina, MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfafetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), receptor Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina, e IFN- γ .

La inmunoglobulina puede ser por ejemplo afelimomab, abciximab, adalimumab, alemtuzumab, arcitumomab, belimumab, canakinumab, cetuximab, denosumab, trastuzumab, imciromab, capromab, infliximab, ipilimumab, abciximab, rituximab, basiliximab, palivizumab, natalizumab, nivolumab, nofetumomab, omalizumab, daclizumab,

ibritumomab, muromonab-CD3, edrecolomab, gemtuzumab, golimumab, certolizumab, eculizumab, ustekinumab, ocrelizumab, de atumumab, obinutuzumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, romosozumab, tocilizumab, tositumomab, clenoliximab, keliximab, galiximab, foravirumab, lexatumumab, bevacizumab, y vedolizumab.

5 La inmunoglobulina es preferentemente una molécula de IgG, tal como la molécula de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Con mayor preferencia, la inmunoglobulina es IgG1. Aún con mayor preferencia, la inmunoglobulina es una IgG1 en la que al menos la parte Fc es humana. La inmunoglobulina puede ser una IgG1 quimérica murina-humana en la que la parte Fc de la IgG1 es humana. Con preferencia superlativa, la inmunoglobulina quimérica es rituximab o infliximab.

El rituximab es un anticuerpo quimérico anti-cd20 que se describe en detalle en, por ejemplo, el documento WO9411026.

10 El infliximab es un anticuerpo quimérico anti-TNFa que se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO9216553.

La inmunoglobulina puede ser una IgG1 humanizada que forma un progenitor murino. Con preferencia superlativa, el anticuerpo humanizado es trastuzumab o bevacizumab.

15 El trastuzumab es un anticuerpo anti-HER2 humanizado que se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO9222653.

El bevacizumab es un anticuerpo anti-VEGF humanizado que se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO9845331.

La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo IgG1 completamente humano. Con preferencia superlativa, el anticuerpo humano es adalimumab o denosumab.

20 El adalimumab es un anticuerpo anti-TNFa humano que se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO9729131.

El denosumab es un anticuerpo anti-RANKL humano que se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO03002713.

En una realización, el anticuerpo puede ser rituximab o adalimumab.

25 Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

30 Además, los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen además anticuerpos "humanizados". Dichos anticuerpos se obtienen mediante la "humanización" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) y que contienen solo secuencias mínimas derivadas de la inmunoglobulina animal. La mayor parte de la molécula es una secuencia humana. Los residuos de una región hipervariable del anticuerpo receptor humano se reemplazan por
35 residuos de una región hipervariable de un anticuerpo donador no humano que tiene las propiedades de unión deseadas.

Finalmente, los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen además anticuerpos completamente humanos que pueden obtenerse mediante el cribado de una biblioteca de anticuerpos humanos.

40 En una realización preferente, la muestra se deriva de un sobrenadante de cultivo celular que se obtiene del cultivo de células CHO recombinantes. Preferentemente, la muestra se obtiene de un cultivo celular recombinante en la fase de crecimiento.

Los medios de cromatografía pueden ser desechables o reutilizables. En una realización, el medio de cromatografía es reutilizable.

En una realización específica, la resina de cromatografía de intercambio iónico de la etapa (a) es reutilizable.

45 Los medios de cromatografía que son reutilizables son rentables en comparación con los medios de cromatografía configurados como desechables. En particular, para la primera etapa de limpieza previa, se usan grandes cantidades de medio de cromatografía. Por lo tanto, es una ventaja particular usar un medio de cromatografía reutilizable, por ejemplo, una resina de cromatografía de intercambio iónico reutilizable para la etapa de limpieza previa.

50 El término "reutilizable", como se usa en la presente memoria, significa que el medio o resina está configurado para ser reutilizado durante más de un ciclo de purificación, es decir, al menos 2, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o más

ciclos de purificación. Entre cada ciclo, el medio o resina de cromatografía pueden lavarse y/o regenerarse y/o almacenarse.

En otra realización específica, el medio de cromatografía de todas las etapas de cromatografía es reutilizable.

5 Por los términos "matriz" o "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el ligando. La matriz de interés en la presente memoria es generalmente una que comprende vidrio, cerámica, sílice, celulosa, agarosa, polímero de metacrilato o poliestireno.

Por "ligando" se entiende cualquier grupo funcional que interactúa con la proteína o con al menos un contaminante y que está unido covalentemente a la "matriz".

10 "Resina" significa cualquier material cromatográfico en forma de perlas que comprende una matriz con un grupo funcional unido (ligando) que puede interactuar con la proteína o al menos un contaminante. Una excepción son las resinas de cromatografía en gel para cromatografía de exclusión por tamaño que típicamente no tienen ligando unido. Las resinas pueden suministrarse como perlas de diferentes tamaños y empaquetarse en columnas. Alternativamente, pueden comprarse columnas preempaquetadas.

15 El procedimiento de la invención puede utilizarse para la purificación de inmunoglobulinas a pequeña y gran escala. Preferentemente, el procedimiento se lleva a cabo a gran escala.

"Pequeña escala", además denominada a "escala de laboratorio", se refiere a la purificación de muestras que contienen menos de 50 g de inmunoglobulina, menos de 10 g de inmunoglobulina o menos de 1g de inmunoglobulina. "Pequeña escala" además se refiere a los procedimientos de purificación en los que la proteína eluida de la columna de la etapa de captura presenta cantidades de menos de 50 g de inmunoglobulina, menos de 10 g de inmunoglobulina o menos de 1g de inmunoglobulina.

20 "Gran escala", también denominada "escala de producción" o "escala de fabricación", se refiere a la purificación de muestras que contienen más de 50 g de inmunoglobulina, más de 100 g de inmunoglobulina, más de 200 g de inmunoglobulina o más de 300 g de inmunoglobulina. "Gran escala" además se refiere a los procedimientos de purificación en los que la proteína eluida de la columna de la etapa de captura presenta cantidades de más de 50 g de inmunoglobulina, más de 100 g de inmunoglobulina, más de 200 g de inmunoglobulina o más de 300 g de inmunoglobulina.

Ejemplos

30 Los procedimientos de la invención para purificar inmunoglobulinas se apoyan e ilustran como referencia a los siguientes ejemplos. Debe enfatizarse que estos ejemplos no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Inmunoglobulinas y cultivo celular

35 Los procedimientos de la invención no dependen de anticuerpos específicos ni de células huésped específicas utilizadas para la expresión de las inmunoglobulinas. Lo mismo es cierto para el modo de expresión y las condiciones de cultivo seleccionadas, que se optimizaron para los rendimientos máximos en la cosecha. Se utilizaron diferentes anticuerpos monoclonales durante el desarrollo de los procedimientos de la invención. Se purificaron con éxito en varias escalas de acuerdo con los procedimientos de la invención. La mayoría de los experimentos seleccionados presentados en las Tablas se realizaron con Rituximab, un anticuerpo IgG1 quimérico humano-ratón, anti-CD20. Además, se realizaron algunos otros experimentos con Adalimumab, un anticuerpo IgG1, anti-TNF α , completamente humano. Ambos anticuerpos se expresaron por vía recombinante en células CHO, que se propagaron en cultivos alimentados por lotes de diferentes escalas. Los experimentos en la fase de desarrollo se realizaron principalmente con fluido de cultivo cosechado en una escala de laboratorio de 100 L. La escala de producción y el volumen de cultivo máximo utilizado en los ejemplos fue de 1.000 L. A menos que se especifique lo contrario, la escala siempre se refiere al volumen de cultivo.

Ejemplo 2: Cosecha de fluido de cultivo celular y etapas de filtración de limpieza previa

45 El siguiente procedimiento se describe para la escala de 1.000 L. Las células y los restos celulares se eliminaron por separación con el uso de un separador LAPX404 (Alfa Laval) a 9600 rpm con una velocidad de flujo de 100 L/h. El fluido de cultivo separado se filtró en serie a través de los siguientes filtros (Pall Corporation): (i) Cápsula de filtro SXLP700416SP, (ii) Cápsula de filtro SXLPDE2408SP y (iii) de nuevo Cápsula de filtro SXLPDE2408SP. Los principios de filtración profunda y micro filtración se logran con esta configuración de filtro. Antes de la primera cromatografía, el fluido de cultivo filtrado se sometió adicionalmente a microfiltración con el uso de un dispositivo de filtro de membrana Sartopore 2/0,2 μ m (Sartorius).

Ejemplo 3: Selección de resinas de cromatografía (Tabla 1 y Tabla 2)

Se probaron para la eficacia de una colección relativamente grande de resinas de cromatografía de procedimientos comunes y potencialmente útiles de diferentes proveedores en un amplio programa de cribado como etapa de limpieza

previa, etapa de captura y etapa de pulido (ver Figura 2A y 2C). Esto se realizó durante la etapa temprana de desarrollo de la presente invención. Las resinas se empaquetaron en pequeñas columnas (10 - 20 ml) y las muestras que contenían Rituximab se tomaron de la escala de laboratorio de 100 L, ya sea directamente después de la separación y filtración (etapas de limpieza previa y captura) o de un eluato de la Proteína A (etapas de pulimento en modo de unión). Se utilizó una mezcla de cromatografía de intercambio catiónico obtenida después de una cromatografía de proteína A y de limpieza previa para las etapas de pulido en modo de flujo continuo. Las corridas cromatográficas se realizaron con un sistema Äkta Purifier (GE Healthcare).

Resinas de limpieza previa: Se probaron ocho resinas de cromatografía de intercambio iónico diferentes y se compararon en un modo de flujo continuo. Las resinas fueron Capto Q, Q-Sepharose FF, Unosphere Q, Nuvia Q, Fractogel TMAE, Poros HQ, Q HyperCel y Toyopearl Super Q 650. Las columnas empaquetadas se equilibraron con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Los criterios de prueba fueron (i) capacidad máxima en términos de volumen de muestra que pasa hasta la separación de los contaminantes, (ii) regeneración (incluyendo la decoloración), y (iii) el grado de precipitación después de una acidificación del flujo continuo recogido por debajo de pH 5,0. Se encontraron cuatro resinas más adecuadas para su uso en una etapa de limpieza previa (Tabla 1) y, excepto Nuvia Q, produjeron resultados similares. Nuvia Q, sin embargo, claramente demostró ser superior y es la resina preferente (Tabla 2).

Resinas de cromatografía de captura por afinidad con proteína A: Se probaron un total de nueve resinas de proteína A diferentes y se compararon en el modo de unión y elución sin aplicar una etapa de lavado. Se usaron las mismas condiciones con respecto al tamaño de la columna, la velocidad de flujo y el tiempo de residencia. El tampón de equilibrio de la columna fue fosfato de Na 40 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La elución se realizó con citrato de Na 100 mM, pH 3,5. Las resinas probadas fueron MabSelect, MabSelect Xtra, MabSelect SuRe, MabSelect SuRe LX, Unosphere Supra, ProSep Ultra Plus, Proteína A Ceramic HyperD F, Poros MabCapture A y Toyopearl rProtein A. Los criterios fueron (i) capacidad de unión dinámica y específica (determinación de la separación), (ii) procedimiento de regeneración requerido, (iii) sensibilidad a la limpieza fuerte (NaOH, urea, Gu-HCl), (iv) pureza del eluato (HCP residual, proteína A lixiviada) y (v) cálculo de costos. En conjunto, se encontraron que tres resinas fueron superiores y más útiles (Tabla 1). Poros MabCapture A y las dos resinas MabSelect SuRe de GE Healthcare fueron los candidatos de resina más promisorios para un procedimiento a gran escala. MabCapture A tenía una capacidad de eliminación de HCP un 15 % menor en comparación con MabSelect SuRe y es la segunda opción. La resina de máxima preferencia es MabSelect SuRe LX, que tenía una capacidad de unión algo superior que MabSelect SuRe (Tabla 2).

Resinas de cromatografía de captura de no afinidad: Se probaron un total de cinco resinas diferentes en esta categoría. Las resinas fueron Capto MMC (Modo mixto), Capto S (intercambiador catiónico), MEP HyperCel (Modo mixto), PPA HyperCel (Modo mixto) y Toyopearl AF Red (ligando colorante en base a Procion Red HE-3B). Los criterios fueron (i) capacidad de unión dinámica y específica (determinación de ruptura), (ii) criterios de elución requeridos, (iii) procedimiento de regeneración (NaOH 0,5M) y (iv) pureza del eluato (HCP). Todas estas resinas (Tabla 1) mostraron capacidades de captura eficientes pero diferente poder de purificación. El HCP en el eluato fue cualitativa y cuantitativamente diferente. La etapa de captura de no afinidad puede aplicarse antes de una cromatografía de afinidad de proteína A posterior (ver Figura 2B) y después funciona, en principio, como una segunda etapa de limpieza previa para aliviar adicionalmente a la valiosa columna de proteína A. Sin embargo, dos resinas de modo mixto resultaron ser superiores y además pueden usarse como una etapa de captura dentro de una secuencia corriente abajo que está desprovista de cualquier etapa de afinidad por proteína A (ver Figura 2C). Estas resinas prometedoras fueron Capto MMC y MEP HyperCel (Tabla 2).

Resinas para cromatografía de pulimento en modo de unión: Con la excepción de una resina de cromatografía de modo mixto, solo se consideraron los intercambiadores catiónicos para esta categoría. Se probaron un gran número (n = 14) de intercambiadores catiónicos comunes: Poros HS, Poros XS, SP Sepharose HP, Capto SP Impres, YMC BioPro 30S, YMC BioPro 70S, Unosphere Rapid S, Unosphere Rapid S40, Nuvia S, Nuvia HR-S, Toyopearl SP 650S, Toyopearl GigaCap S 650S, Millipore ProRes S y Fractogel EMD SO₃. Las columnas se cargaron con el eluato de la Proteína A (MabSelect SuRe), que comprende Rituximab y bajas cantidades de contaminantes, ajustadas a una concentración de proteína de 10 mg/ml con tampón de equilibrio. No todas las resinas se probaron en la misma medida. Además de las capacidades de unión dinámicas y específicas (determinación de ruptura) además se investigó la capacidad de separar el HCP residual y las impurezas relacionadas con el producto (agregados, variantes de carga no deseadas). La elución se realizó con gradientes crecientes de sal y/o pH. Las resinas mostraron diferencias significativas en cuanto a la separación de las impurezas en las fracciones ácidas (variantes de carga) y básicas (agregados). Este criterio se ponderó porque es el propósito destinado para una etapa de pulido de la inmunoglobulina. Se encontró que un total de seis resinas eran adecuadas para una etapa de pulido (Tabla 1). Entre Poros 50 HS, SP Sepharose HP, Capto SP Impres, Nuvia HR-S, Toyopearl SP 650S y Fractogel EMD SO₃, el intercambiador catiónico de Applied Biosystems, Poros HS 50 y una resina de Bio-Rad, Nuvia HR-S, mostraron el mejor potencial de eliminación de los contaminantes HCP, agregados, variantes de carga indeseadas y proteína A lixiviada. Además, CaptoAdhere, una resina de modo mixto positivamente cargada de GE Healthcare, se investigó por su utilidad como etapa de pulido en el modo de unión. La misma muestra, tamaño de columna y criterios se aplicaron de la misma manera que para los intercambiadores catiónicos. El tampón de equilibrio fue fosfato de Na 20 mM, pH 8,2 y el pH de la muestra se ajustó a 8,2 con NaOH y se diluyó adicionalmente con tampón de equilibrio. Aunque la resina es capaz de unir cantidades superiores, se requiere una carga de 20-23 mg/ml de Rituximab para una separación eficiente. La elución de la proteína unida se realizó con fosfato de Na 20 mM, pH 6,0. La resina CaptoAdhere en el modo de unión mostró

un poder de eliminación muy prometedor para contaminantes y se seleccionó como resina preferida para una etapa de pulido (Tabla 2).

5 *Resinas para cromatografía de pulido en modo de no-unión:* En esta categoría solo se consideraron intercambiadores iónicos y una resina de modo mixto. Se probaron un total de siete intercambiadores aniónicos comunes diferentes: Poros HQ, Capto Q, Unosphere Q, Nuvia Q, Toyopearl GigaCap Q 650, Q HyperCel y Fractogel EMD TMAE. Los
10 criterios fueron: pureza máxima de rituximab en el flujo continuo obtenido con un enfoque especial en agregados residuales, HCDNA y HCP. Las columnas se cargaron con una mezcla de intercambiadores catiónicos (Poros HS) después de una etapa de Proteína A (MabSelect SuRe). Tres resinas de cromatografía de intercambio iónico, Poros HQ, Capto Q y Nuvia Q fueron las más adecuadas para su uso en una etapa de pulido en modo de flujo continuo (Tabla 1). Además, CaptoAdhere, una resina de modo mixto positivamente cargada de GE Healthcare, se investigó
15 por su utilidad para una etapa de pulido en el modo de flujo continuo. La misma muestra, tamaño de columna y criterios se aplicaron de la misma manera que para los intercambiadores iónicos. El tampón de equilibrio de la columna fue fosfato de Na 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8. La resina CaptoAdhere mostró un notable poder de eliminación de contaminantes además en el modo de flujo continuo y fue ligeramente superior a las resinas de cromatografía de intercambio iónico. Esto se explica fácilmente por la interacción hidrofóbica adicional que complementa la función de intercambio iónico. Por lo tanto, CaptoAdhere se seleccionó como resina preferida para una etapa de pulido en modo de flujo continuo (Tabla 2).

20 Tabla 1: Resinas de procedimiento adecuadas para su uso como etapa(s) de cromatografía de limpieza previa, captura y pulido [AEX = cromatografía de intercambio iónico; CEX = cromatografía de intercambio catiónico; MMC = cromatografía en modo mixto]:

Tipo y modo	Resina	Suministrador	Idoneidad
Etapa de limpieza previa AEX de flujo continuo	Poros HQ	Applied Biosystems	+
	Fractogel TMAE	EMD Millipore	+
	Capto Q	GE Healthcare	+
	Nuvia Q	Bio-Rad	++
Etapa de captura de proteína A por afinidad	Poros MabCapture	Applied Biosystems	+
	MabSelect SuRe	GE Healthcare	++
	MabSelect SuRe LX	GE Healthcare	++
Etapa de captura de no afinidad	Toyopearl AF Red	Tosoh Biosciences	+
	PPA Hypercel	Pall Corporation	+
	MEP Hypercel	Pall Corporation	++
	Capto MMC	GE Healthcare	++
	Capto S	GE Healthcare	+
Modo de unión etapa de pulido (CEX o MMC)	Capto SP ImpRes	GE Healthcare	+
	Fractogel EMD SO3	EMD Millipore	+
	Toyopearl SP 650S	Tosoh Biosciences	+
	Sepharose SP HR	GE Healthcare	+
	Nuvia HR-S	Bio-Rad	++
	Poros 50 HS	Applied Biosystems	++
	CaptoAdhere	GE Healthcare	++
Etapa de pulido de flujo continuo (AEX o MMC)	Poros 50 HQ	Applied Biosystems	+
	Capto Q	GE Healthcare	+
	CaptoAdhere	GE Healthcare	++
	Nuvia Q	Bio-Rad	+

+ = resina adecuada; ++ = resina preferida

Tabla 2: Resinas de cromatografía preferentes [AEX = cromatografía de intercambio iónico; CEX = cromatografía de intercambio catiónico; MMC = cromatografía en modo mixto]:

Etapa de procedimiento	Resina	Tipo	Ligando	Suministrador
Limpieza previa	Nuvia Q	AEX	Trimetilamonio	Bio-Rad

Etapa de procedimiento	Resina	Tipo	Ligando	Suministrador
Captura	MabSelect SuRe LX	Afinidad	Derivado de la proteína A estabilizada con álcali	GE Healthcare
Captura	MEP Hypercel	MMC	4-mercapto-etil-piridina	Pall Corporation
Captura	Capto MMC	MMC	Intercambiador catiónico débil multimodal	GE Healthcare
Pulido	Poros 50 HS	CEX	Sulfopropilo	Applied Biosystems
Pulido	Nuvia HR-S	CEX	Sulfonato	Bio-Rad
Pulido	CaptoAdhere	MMC	N-bencil-N-metiletanolamina	GE Healthcare

Ejemplo 4: Etapa de cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa

Una escala de 100 L (Rituximab o Adalimumab) y una escala de 1.000 L (Rituximab) se purificó sobre las secuencias corriente abajo que se muestran en las Figuras 2A-C. La resina preferida para la etapa de cromatografía de limpieza previa es Nuvia Q realizada en el modo de flujo continuo. Esta etapa del procedimiento se realizó con fluidos de cultivo obtenidos después de los procedimientos de filtración de limpieza previa descritos en el Ejemplo 2. La cromatografía de limpieza previa se realizó en el modo de flujo continuo con la resina de cromatografía de intercambio iónico Nuvia Q para reducir la carga de impurezas (HCP, HCDNA, agregados, lípidos, pigmentos, etc.) durante la siguiente etapa de captura. La columna empaquetada con la resina (dimensión para la escala de 1.000 L = 60 cm de diámetro x 16 cm de altura, volumen empaquetado de aproximadamente 45 L; dimensión para la escala de 100 L = 14 cm de diámetro x 27 cm de altura, volumen empaquetado de aproximadamente 4,1 L;) se equilibró consecutivamente con WFI (2 VC), Tris-ácido acético 1M pH 6,0 (3 VC) y Tris-ácido acético 20 mM pH 7,2 (4 VC). La solución del producto se pasó a través de la columna (17 g/L de resina) seguido por WFI (2 VC) con un caudal de aproximadamente 200 cm/h. La regeneración de la resina Nuvia Q se realizó lavando en dirección inversa consecutivamente con (i) NaH₂PO₄ 40 mM, EDTA 10 mM, urea 2M, NaCl 1,5M, pH 7,2 (4 VC), (ii) ácido cítrico 100 mM, NaCl 2M (10 VC), (iii) WFI (4 VC), (iv) NaOH 1M (4 VC) y (v) NaOH 10 mM (2 VC). La columna se almacenó luego en solución de NaOH 10 mM.

Ejemplo 5: Efecto de la etapa de cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa sobre la reutilización de MEP HyperCel utilizado como resina de captura (Tabla 3)

MEP HyperCel es una resina de no afinidad preferida para una etapa de captura que se puede aplicar en un procedimiento a gran escala con (Figura 2B) o sin (Figura 2C) una etapa de afinidad por proteína A posterior. Se encontró que la contaminación (falta) de la columna MEP HyperCel es una desventaja severa. Sin embargo, esto puede evitarse o reducirse en gran medida al aplicar una columna de intercambio iónico de limpieza previa, que fue Nuvia Q en este ejemplo. Sin una columna previa Nuvia Q, la reutilización de MEP HyperCel requiere de procedimientos de regeneración rigurosos, duraderos y costosos, e incluso después la vida útil es limitada. Los experimentos de la Tabla 2 se realizan con columnas modelo pequeñas (20 ml) empaquetadas con Nuvia Q y MEP HyperCel, respectivamente. La carga de la muestra y el rendimiento de la cromatografía Nuvia Q fueron como se describe en el Ejemplo 4. El flujo continuo se cargó inmediatamente en el MEP HyperCel sin ajustes. En paralelo, se cargó directamente una segunda columna de captura, es decir, pasando la etapa de Nuvia Q, con fluido de cultivo de acuerdo con el Ejemplo 2. La columna de captura se cargó hasta que se alcanzó la capacidad máxima y el producto apareció en el flujo continuo (ruptura). La IgG unida se eluyó de la columna MEP HyperCel por disminución del pH (pH 4). La capacidad de unión se calculó a partir del volumen hasta la ruptura. La resina de modo mixto fue simplemente regenerada y reequilibrada para la próxima corrida. La regeneración de MEP Hypercel se realizó en flujo inverso mediante el paso de una solución de ácido cítrico 100 mM, seguido de NaOH 1M. El tiempo de contacto con NaOH fue de 60 minutos, después de lo cual se preparó la columna para el siguiente uso mediante reequilibrio y eliminación completa de NaOH (control de pH). La columna Nuvia Q se regeneró como se describe en el Ejemplo 4. Se realizaron un total de ocho ciclos (siete reutilizaciones). Los resultados se resumieron en la Tabla 3 y respaldan la superioridad de la etapa de Nuvia Q. No hubo cambios en la capacidad de unión cuando se aplicó la limpieza previa de Nuvia Q. En contraste, sin dicha etapa, hubo una disminución en la capacidad de unión de una corrida a otra que descendió hasta el 64 % después de ocho ciclos.

Tabla 3: Efecto de una cromatografía de intercambio iónico (AEX) en modo de flujo continuo como etapa de limpieza previa sobre la reutilización de la resina MEP HyperCel de modo mixto utilizada como etapa de captura (capacidad de unión de IgG por ml de resina):

Número de ciclo	MEP Hypercel	AEX → MEP HyperCel
1	16,5 mg/ml	16,1 mg/ml
2	13,2 mg/ml	16,0 mg/ml
3	12,6 mg/ml	15,9 mg/ml

Número de ciclo	MEP Hypercel	AEX → MEP HyperCel
4	11,9 mg/ml	16,2 mg/ml
5	11,5 mg/ml	16,1 mg/ml
6	11,0 mg/ml	15,9 mg/ml
7	10,7 mg/ml	16,0 mg/ml
8	10,5 mg/ml	15,9 mg/ml

Ejemplo 6: Cromatografía de captura Capto MMC

La resina Capto MMC es un medio de cromatografía de modo mixto negativamente cargado (ver Tabla 2) y se aplicó dentro de la secuencia corriente abajo que se muestra en los esquemas de flujo del procedimiento de la Figura 2B (procedimiento de cinco columnas) y la Figura 2C (procedimiento de cuatro columnas). En estas secuencias, el Capto MMC funciona en principio como una segunda etapa de limpieza previa para purificar la muestra y eliminar los contaminantes críticos, tales como proteasas, que pueden dañar la resina de cromatografía de afinidad de la proteína A posterior. Además, esta etapa permite una concentración de muestra significativa y, por lo tanto, reduce el tiempo de procedimiento de la cromatografía de proteína A. La cromatografía Capto MMC se realizó en el modo de unión y se cargó con el flujo continuo de Nuvia Q descrito en el Ejemplo 4, que se ajustó a pH 5 con ácido acético. Ambas escalas de 100 L y 1.000 L de Rituximab se purificaron de acuerdo con este procedimiento. La dimensión de la columna para la escala de 1.000 L fue de 60 cm de diámetro x 15 cm de altura (volumen empaquetado de aproximadamente 42 L) y para la escala de 100 L 20 x 14 cm (volumen empaquetado de aproximadamente 4,4 L). La resina se equilibró con 20 mM de acetato de Na, pH 5,0 y la columna con el Rituximab unido se lavó con 40 mM de fosfato de Na, pH 6,5. La elución se optimizó para una recuperación máxima y se realizó con fosfato de Na 40 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5. Las velocidades de flujo fueron de 150-200 cm/h. El eluato se cargó directamente en la columna de proteína A.

Ejemplo 7: Cromatografía de captura de proteína A

La cromatografía de captura de proteína A se realizó con MabSelect SuRe (escala de 100 L) o MabSelect SuRe LX (1.000 L). Excepto por las escalas de las columnas, los parámetros de procesamiento fueron similares. La muestra se tomó después de los procedimientos aplicados en el Ejemplo 4 (procedimiento de la Figura 2A, flujo continuo de Nuvia Q) o después de los procedimientos aplicados en el Ejemplo 6 (procedimiento de la Figura 2B, eluato de Capto MMC). La dimensión de la columna para la escala de 1.000 L fue de 40 cm de diámetro x 30 cm de altura (volumen empaquetado de aproximadamente 38 L) y para la escala de 100 L 20 x 10,4 cm (volumen empaquetado de aproximadamente 3,2 L). La columna de Proteína A se equilibró con fosfato de Na 40 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. A menos que se especifique de cualquier otra manera, la solución del producto se cargó con 20 g de proteína/L de resina (escala de 100 L) o 35 g de proteína/L de resina (escala de 1.000 L). La columna se lavó con tampón de equilibrio (2 VC), seguido de fosfato de Na 40 mM, NaCl 1,5M, urea 2M, EDTA 10 mM, pH 7,4. La elución se realizó con citrato de Na 100 mM, pH 3,5. Las velocidades de flujo fueron de 140 cm/h. La regeneración de la resina Mabselect SuRe o MabSelect SuRe LX se realizó mediante lavado en dirección inversa consecutivamente con (i) NaOH 0,2M (2 VC), (ii) WFI (2 VC), ácido acético al 3,5 %, sulfato de sodio 100 mM (2 VC) y (iii) WFI (2 VC). La columna se volvió a equilibrar para la siguiente corrida o se almacenó en etanol al 20 %.

Ejemplo 8: Efecto de la cromatografía de intercambio iónico previa a la limpieza sobre la proteína A lixiviada (Tabla 4)

Para investigar el efecto de una cromatografía de limpieza previa (Nuvia Q) y la temperatura sobre la lixiviación de la proteína A (MabSelect SuRe LX), se realizó una serie de experimentos en una cromatografía de afinidad de proteína A a escala reducida. Las columnas usadas tenían un volumen de 12 ml. Se aplicó un sistema Äkta Purifier (GE Healthcare) para las corridas cromatográficas. Las muestras fueron pequeñas alícuotas tomadas de un lote de 1.000 L de Rituximab. Las muestras se tomaron ya sea de la etapa del procedimiento obtenido después de los procedimientos descritos en el Ejemplo 2 (antes de la etapa de limpieza previa de Nuvia Q) o después de los procedimientos descritos en el Ejemplo 3 (después de la etapa de limpieza previa de Nuvia Q). El procedimiento de la cromatografía de afinidad de proteína A se realizó de acuerdo con el ejemplo 7. Las columnas se cargaron con 25-30 mg de proteína/ml de resina. La cromatografía de afinidad de Proteína A y la muestra se mantuvieron a temperatura ambiente (20 - 25 °C) o se colocó en una cámara de enfriamiento (2 - 8 °C). Se tomaron dos muestras paralelas de dos alícuotas diferentes, respectivamente, y se purificaron y analizaron en paralelo. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Los valores medios de las dos corridas paralelas de lixiviación a temperatura ambiente sin una etapa anterior de Nuvia Q fueron 23,4 ng/mg (equivalente de proteína A por mg de IgG). El efecto de la etapa de limpieza previa es evidente (Tabla 4). A temperatura ambiente, solo 9,1 ng/mg (= 39 %) de la lixiviación se produjo cuando la muestra se pasó a través de una columna Nuvia Q antes de la etapa de proteína A. En las bajas temperaturas, la cual tuvo un efecto significativo propiamente en la lixiviación, además se observa el efecto. La lixiviación sin Nuvia Q fue de 5,0 ng/mg y con Nuvia Q fue de 3,4 ng/mg (68 %) en promedio (Tabla 4). Una etapa de Nuvia Q reduce significativamente la lixiviación de la proteína A y permite que se utilice la temperatura ambiente con mayor preferencia para la etapa de

cromatografía de afinidad. El efecto de Nuvia Q sobre la lixiviación de la proteína A se explica mejor por la captura de actividades proteolíticas que se unen a la resina Nuvia Q.

Tabla 4: Efecto de la etapa de cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa (Nuvia Q) sobre la proteína A lixiviada (de MabSelect SuRe LX) medida en el eluato de proteína A. Se realizaron dos cromatografías paralelas a dos temperaturas diferentes:

Temperatura	Muestra	Lixiviación de Proteína A	
		Sin limpieza previa	Con limpieza previa
Temperatura ambiente (20 - 25 °C)	1	25,1 ng/mg	10,3 ng/mg
	2	21,6 ng/mg	7,8 ng/mg
Enfriado (2 - 8 °C)	3	4,9 ng/mg	3,1 ng/mg
	4	5,0 ng/mg	3,6 ng/mg

Ejemplo 9: Columnas de limpieza previa y captura conectada

Dado que la etapa de intercambio iónico de limpieza previa con Nuvia Q se realizó en flujo continuo y la posterior resina de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe LX) es capaz de capturar la inmunoglobulina de manera eficiente a través de este flujo, fue posible conectar directamente la columna Nuvia Q con la columna MabSelect SuRe LX. Los procedimientos corriente abajo resumidos en las Figuras 2A y 2B se ejecutaron a partir de una escala de 1.000 L (Rituximab) con tales columnas de limpieza previa y captura conectadas. Pero además se realizaron los procedimientos a escala de 100 L con columnas conectadas a menos que se especifique lo de cualquier otra manera. Las dos columnas se equilibraron por separado y después se conectaron por conmutación de válvula. La solución del producto se cargó con aproximadamente 100 L/h (escala de 1.000 L) o aproximadamente 10 L/h (escala de 100 L) en las columnas conectadas en la dirección del flujo ascendente como se describió en el ejemplo 4 para Nuvia Q. Después del lavado con WFI (2 VC) la columna Nuvia Q se puenteó por conmutación de válvula en el patín de cromatografía y se regeneró en el flujo inverso como se describió en el Ejemplo 4. El procesamiento adicional, es decir, lavado, elución y regeneración de la columna de proteína A se realizó en la configuración desconectada como se describió en el ejemplo 7.

Ejemplo 10: Inactivación viral

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, una etapa de inactivación viral tiene lugar después de la cromatografía de afinidad con Proteína A. Se aprovecha la elución de pH bajo de la matriz de afinidad. En dicho ambiente ácido acuoso, muchos virus, especialmente los del tipo envuelto, son inestables y se desintegran. El procedimiento de Proteína A desarrollado para la presente invención produce un eluato que tiene un pH de 3,5 (ver Ejemplo 7). De manera similar, el eluato de la columna de captura de modo mixto (MEP HyperCel o Capto MMC) tiene un pH bajo de 4 (ver ejemplos 5 y 6). En lo adelante se describe la inactivación para el eluato de MabSelect SuRe LX (escala de 1.000 L, Rituximab). El anticuerpo monoclonal se eluyó de la columna de proteína A en tampón de citrato de Na 100 mM, pH 3,5 directamente en el tanque de inactivación viral A. El eluato se diluyó aproximadamente 2 veces mediante WFI directamente en el tanque A. El pH de la solución se controló y se reajustó a 3,5 con ácido cítrico 100 mM, si necesario, y la solución se transfirió posteriormente al tanque B de inactivación viral, donde se agitó a 65 rpm a una temperatura de 20-24 °C durante 60 minutos. Después, el pH de la solución se ajustó a pH 4,5 con NaOH 50 mM, proporcionando la condición inicial para la posterior etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

Ejemplo 11: Cromatografía de intercambio catiónico con Poros 50 HS (Pulido 1)

La separación de contaminantes y sustancias relacionadas con el producto, tales como las variantes de carga, se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico, siendo la primera etapa de pulido. Esta etapa se incluyó en todas las secuencias de purificación (100 L de rituximab y adalimumab, 1.000 L de rituximab). La columna empaquetada con la resina Poros 50 HS (dimensión para la escala de 1.000 L = 60 cm de diámetro x 32 cm de altura, volumen empaquetado de aproximadamente 90 L; dimensión para la escala de 100 L = 25 cm de diámetro x 15 cm de altura, volumen empaquetado de aproximadamente 7,3 L) se equilibró consecutivamente con (i) WFI (agua para inyección, 2 VC) y (ii) citrato de Na 20 mM, pH 5,5 (4 VC). La solución del producto obtenida después de la inactivación viral y los ajustes de la muestra (pH 4,5) como se describió en el Ejemplo 10 se cargó en la columna con aproximadamente 8 g de proteína/L de resina, pasando así un prefiltro Kleenpak Nova de 0,45 µm (Pall Corporation). La columna se lavó con WFI (1 VC) antes de seguir una elución por gradiente. El gradiente se formó mezclando 20 mM de citrato de Na, pH 5,5 (tampón A) y 40 mM de fosfato de Na, pH 7,8 (tampón B) en las siguientes relaciones y secuencia: (i) A al 100 % (0,2 VC), (ii) gradiente lineal a 40 % A + 60 % B (2 VC); (iii) gradiente lineal a 100 % B (6 VC); (iv) B al 100 % (2 VC). Las velocidades de flujo fueron de 150 cm/h. El eluato se separó en fracciones para permitir el mezclado específica. La regeneración de la resina Poros 50 HS se realizó lavando consecutivamente con (i) NaCl 2M (1 VC) y (ii) NaOH 1M (2 VC). La columna se almacenó luego en NaOH 10 mM.

Ejemplo 12: Cromatografía en modo mixto con CaptoAdhere (Pulido 2)

La segunda etapa de pulido es opcional y se aplicó para escalas de 100 L y 1.000 L de Rituximab. La resina seleccionada para la cromatografía final en los procedimientos con dos etapas de pulido (Figura 2A y 2B) fue CaptoAdhere, la que usa el ligando N-bencil-N-metil etanolamina. El ligando lleva grupos cargados positivamente y, por lo tanto, proporciona además de las interacciones hidrófobas además funciones de intercambio iónico. La cromatografía puede reducir aún más las trazas restantes de contaminantes, tales como HCDNA y HCP. La proteína A lixiviada residual, los agregados del producto y los fragmentos del producto pueden eliminarse además en esta etapa. La etapa de pulido CaptoAdhere se realizó en modo de flujo continuo, así como en modo de unión.

Cromatografía CaptoAdhere en modo de flujo continuo: La muestra para esta cromatografía final fue la mezcla de Poros 50 HS posterior a los procedimientos descritos en el Ejemplo 11. El tamaño de la columna empaquetada para la escala de 1.000 L fue de 14 cm de diámetro x 13 cm de altura (volumen empaquetado de aproximadamente 2 L) y para la escala de 100 L 5 x 13 cm (volumen empaquetado de aproximadamente 0,2 L). La columna se equilibró con fosfato de Na 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8. El pH de las fracciones mezcladas se ajustó a 7,8 con NaOH 0,2 M y la conductividad se elevó a 10-12 mS/cm con NaCl 1 M. La mezcla ajustada se pasó a través de la columna CaptoAdhere con una carga de 250-275 g de proteína/L de resina y se recogió todo el flujo continuo. Las velocidades de flujo fueron de 300 cm/h. La regeneración de la resina CaptoAdhere se realizó lavando consecutivamente con (i) ácido cítrico 100 mM, NaCl 2M (2 VC), (ii) NaCl 2M (1 VC), (iii) NaOH 1M (2 VC) y (iv) NaOH 10 mM (2 VC). La columna se almacenó luego en NaOH 10 mM.

Cromatografía CaptoAdhere en modo de unión: El pH y la conductividad del conjunto de Poros 50 HS obtenidos después de los procedimientos descritos en el Ejemplo 11 se ajustaron a pH 8,2 y 3,2 mS/cm, respectivamente. El tamaño de la columna empaquetada para la escala de 1.000 L fue de 40 cm de diámetro x 28 cm de altura (volumen empaquetado de aproximadamente 35 L) y para la escala de 100 L 14 x 27 cm (volumen empaquetado de aproximadamente 4,1 L). La columna se equilibró con fosfato de Na 20 mM, pH 8,2. La solución del producto se cargó en la columna con 15-20 g de proteína/L de resina. La elución se realizó con fosfato de Na 20 mM, pH 6,0. Las velocidades de flujo fueron de 300 cm/h. La columna se regeneró como se describió para el procedimiento del modo de flujo continuo.

Ejemplo 13: Etapas finales de filtración

Entre la última cromatografía y el llenado del volumen final de la sustancia farmacológica, se requieren varias etapas de filtración para formular en el tampón de almacenamiento seleccionado, fijar las concentraciones deseadas y eliminar los virus. Los procedimientos de purificación de la invención para inmunoglobulinas no dependen de estos procedimientos de filtración. Por lo tanto, los procedimientos, el equipamiento y las membranas seleccionadas en este ejemplo deben entenderse como una opción y son posibles cambios discretos. Los procedimientos para la escala de 1.000 L para un procedimiento con dos etapas de pulido se describen brevemente a continuación.

Intercambio de tampones mediante ultrafiltración de flujo tangencial/diafiltración (UF/DF): El eluato de la columna CaptoAdhere se recogió en el tanque del patín UF/DF y se concentró a 8 g/L con el uso del casete de membrana Omega Centrasette (Pall Corporation, valor de corte de 30 kD). El retenido se diafiltró con el uso de 10 volúmenes de tampón de formulación (citrato de sodio 25 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5).

Eliminación de virus por nanofiltración: La nanofiltración es la etapa de eliminación de virus más exigente y más confiable que funciona sobre la base de la exclusión de tamaño en el intervalo de nanómetros. La solución del producto diafiltrado se transfirió a un tanque móvil y después se sometió a nanofiltración con el uso de un filtro Viresolve Pro Modus 1,3 (Millipore, tamaño de poro de 20 nm). El filtro se acondicionó con citrato de Na 25 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5 antes de la filtración de la solución del producto. Para la protección del nanofiltro se aplicó un prefiltro Sartopore 2 MidiCaps (Sartorius, tamaño de poro de 0,2 µm). La filtración se realizó por sobrepresión a un máximo de 2 bar.

Concentración y formulación final por ultrafiltración de flujo tangencial/diafiltración (UF/DF): La solución de producto nanofiltrado se recogió en el tanque del patín UFDF y se concentró a aproximadamente 10,2 g/L con el uso de un casete de membrana Omega Centrasette (Pall Corporation, valor de corte de 30kD). La solución del producto concentrada se transfirió a un tanque móvil. El tanque se colocó bajo un flujo de aire laminar y se añadió Tween 80 a una concentración final de 0,09 % (p/p).

Microfiltración final (filtración estéril): La microfiltración final se realizó con una cápsula de filtro Mini Kleenpak de 0,2 µm (Pall Corporation).

Ejemplo 14: Purezas finales de lotes obtenidos por diferentes procedimientos (Tabla 5)

Los resultados con respecto a la pureza final de dos lotes representativos producidos por el procedimiento convencional de la Figura 2A (de acuerdo, por ejemplo, Fahrner RL 2001) y el nuevo procedimiento de la Figura 2B se resumen en la Tabla 5. La inmunoglobulina fue Rituximab y se purificó a partir de la escala de 100 L. Los etapas del procedimiento del procedimiento convencional de purificación (procedimiento 1B) consisten en tres cromatografías, (i) MabSelect SuRe (captura), (ii) Poros 50 HS (modo de unión) y (iii) Poros 50 HQ (modo de flujo continuo). La secuencia de cromatografía del nuevo procedimiento (procedimiento 2B) consiste en (i) Nuvia Q (limpieza previa), (ii) Capto MMC (captura), (iii) MabSelect SuRe (intermedio), (iv) Poros 50 HS (modo unión, pulido 1) y (v) CaptoAdhere (modo flujo continuo, pulido 2). Los etapas individuales se realizaron como se describió en los Ejemplos 1, 2, 4, 6, 7 y

10-13. Los parámetros de pureza seleccionados para la Tabla 5 son (i) la cantidad relativa del monómero de IgG (en %), (ii) las proteínas residuales de la célula huésped (HCP, en ng/mg de IgG) y (iii) el ADN de la célula huésped residual (HCDNA en pg/g de IgG). Otros procedimientos analíticos se describen en el Ejemplo 15 a continuación. El lote purificado de acuerdo con el nuevo procedimiento 2B tenía una mayor pureza en comparación con el lote purificado de acuerdo con el procedimiento clásico 1B como se observa con los tres parámetros (Tabla 5).

Tabla 5: Comparación de la calidad de dos lotes purificados obtenidos por dos procedimientos diferentes, el procedimiento convencional (1B) y uno de los procedimientos de la invención (2B). El "procedimiento 1B" se refiere al procedimiento estándar sin una etapa de cromatografía de limpieza previa como se muestra en la Figura 1B. El "procedimiento 2B" se refiere al procedimiento de la invención que se muestra en la Figura 2B, que incluye una etapa de cromatografía de limpieza previa (flujo continuo en Nuvia Q) y una etapa de captura en cromatografía de modo mixto (Capto MMC) seguido de Proteína A (MabSelect SuRe). Los procedimientos de prueba fueron: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SEC-HPLC), ensayo por inmovinoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los parámetros de prueba fueron IgG monomérica en porcentaje, proteína de la célula huésped (HCP) por mg de IgG y ADN de la célula huésped (HCDNA) por g de IgG.

Procedimiento de prueba	Parámetro	Procedimiento 1B	Procedimiento 2B
SEC-HPLC	Monómero (%)	99,6	99,7
ELISA	HCP (ng/mg)	4,3	1,1
qPCR	HCDNA (pg/g)	289	142

Ejemplo 15: Procedimientos analíticos

Se aplicaron varios procedimientos analíticos tanto durante el procedimiento como al final del procedimiento para caracterizar la calidad de las inmunoglobulinas purificadas. Estos procedimientos fueron procedimientos estándar y se describen en la literatura, por ejemplo, el Eur. Pharm. Los principios de los procedimientos que produjeron los resultados para las Tablas se describen brevemente a continuación:

Cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (SEC-HPLC): El procedimiento SEC-HPLC se aplicó para la determinación de impurezas con masas moleculares diferentes a las de la inmunoglobulina. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica en base a la separación de moléculas en función de los diámetros hidrodinámicos que son proporcionales a sus tamaños. Se usó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento para SEC (SEC-HPLC) que tenía una resolución mucho mejor que la SEC convencional. La cromatografía se realizó como se describe en la literatura (por ejemplo, en el documento WO2013067301) para cuantificar monómeros, dímeros, agregados y fragmentos de la inmunoglobulina. La detección de las proteínas fue en base a la absorción de UV. La pureza relativa se refiere al área del pico de monómero integrado en % del área total de todos los picos. Los resultados de la prueba se calcularon a partir del promedio de mediciones repetidas.

Ensayo de inmovinoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para cuantificar las proteínas de la célula huésped (HCP): La medición se realizó mediante un procedimiento ELISA sándwich. Las proteínas de la célula huésped CHO se unen a anticuerpos anti-CHO específicos inmovilizados en la superficie de poliestireno de una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos, seguido de la unión a un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Posteriormente, la reacción enzimática se realizó adicionando el sustrato 3,3',5,5' de tetrametilbencidina (TMB) a los pocillos que, dependiendo de la presencia del conjugado de anticuerpo-peroxidasa, resulta en un producto coloreado, detectable por absorbancia de luz VIS. La placa de microtitulación se leyó a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620 nm).

Ensayo de inmovinoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para cuantificar la Proteína A lixiviada: La medición se realizó con el uso del kit ELISA MabSelect Sure Ligand disponible en el mercado de Repligen. Los ligandos de MabSelect Sure lixiviados se unen a anticuerpos de conejo anti-Proteína A inmovilizados en la superficie de poliestireno de una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos, seguido de la unión a un anticuerpo secundario marcado con biotina. La presencia de biotina unida se detectó incubando los pocillos con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Posteriormente, la reacción enzimática se realizó adicionando el sustrato 3,3',5,5' de tetrametilbencidina (TMB) a los pocillos que, dependiendo de la presencia del conjugado de anticuerpo-peroxidasa, resulta en un producto coloreado, detectable por absorbancia de luz VIS. La placa de microtitulación se leyó a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620 nm). La sensibilidad del ensayo fue de 0,1 ng/ml de muestra.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para cuantificar el ADN de la célula huésped (HCDNA): La medición se realizó mediante un procedimiento de PCR cuantitativa en tiempo real en base a la química TaqMan (Applied Biosystems). El procedimiento es muy sensible y específico para detectar la contaminación del ADN. El ensayo es en base a la amplificación de secuencia específica y la detección de fluorescencia en tiempo real de fragmentos de ADN bien definidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de cebadores específicos de secuencia (SSP) y sondas de hibridación marcadas con fluorescencia (TaqMan®). Todo el procedimiento, que incluye la instrumentación, los reactivos, el muestreo y el cálculo basado en software, se realizó

de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la reacción de PCR, se sintetiza una gran cantidad de ADN bicatenario a partir de la región de ADN inicial determinada por un cebador específico. Las sondas de oligonucleótidos que están marcadas con el reportero y el colorante de extinción se unen a las regiones del ADN molde que se multiplicará. Durante la reacción de PCR, la ADN polimerasa descompone la sonda, de manera que la proximidad física de los dos terminales con colorante y el reportero emite una luz fluorescente que es proporcional al producto sintetizado de la reacción de PCR. La sonda y los cebadores específicos de CHO se usan en la medición, que multiplica la cantidad de las regiones apropiadas del ADN de la célula huésped CHO. Durante esta etapa, la señal fluorescente aumenta y después de un cierto número de ciclos, la fluorescencia excede un umbral. Este número de ciclos es proporcional a la cantidad inicial de ADN. Es posible determinar la cantidad absoluta de ADN de la célula huésped en las muestras comparando el número de ciclos obtenidos con la muestra con una curva de calibración.

Ejemplo 16: Validación de la eliminación e inactivación de los virus

La eliminación y/o la inactivación viral son necesarias para el procedimiento de producción de un fármaco de proteína recombinante, tal como un anticuerpo monoclonal producido por cultivo celular, debido a la preocupación por la contaminación con virus de materias primas o etapas de producción. Como resultado, existe una demanda reguladora considerable para la seguridad viral de cada procedimiento de fabricación que resulta en una proteína terapéutica biológica derivada de cultivos celulares. El procedimiento corriente abajo debe ser validado por su capacidad para eliminar y/o inactivar posibles contaminaciones virales de conformidad con las guías existentes de las autoridades reguladoras respectivas, por ejemplo, la Agencia Europea de Medicina (EMA) y la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). El objetivo del estudio realizado sobre el aclaramiento viral fue demostrar la eliminación e inactivación viral efectiva durante el procedimiento de fabricación, como parte de la demostración de la seguridad general de los fármacos de proteínas recombinantes a partir de fuentes de cultivo celular.

Selección de las etapas del procedimiento: El procedimiento corriente abajo del anticuerpo IgG1 Rituximab se validó para las etapas seleccionados. Los etapas del procedimiento analizados fueron versiones representativas a escala reducida de las etapas correspondientes a gran escala como se describe en los ejemplos anteriores. Se seleccionaron cuatro etapas del procedimiento:

- a) Cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa con Nuvia Q (ver Ejemplo 4)
- b) Inactivación viral del eluato de Proteína A a pH bajo (ver Ejemplo 10)
- c) Cromatografía de intercambio catiónico con Poros HS (ver Ejemplo 11)
- d) Nanofiltración con Viresolve Pro (ver Ejemplo 13)

Selección de virus: Se seleccionaron dos virus modelo frecuentemente usados:

- a) Virus de la leucemia murina (MuLV)
- b) Virus Diminuto de Ratones (MVM)

MuLV es miembro de Retroviridae, que son virus de ARN monocatenarios con una envoltura y un tamaño de aproximadamente 80-100 nm. MVM es un miembro de Parvoviridae, que son virus de ADN monocatenarios sin envoltura. Los parvovirus pertenecen a los virus más pequeños conocidos, con tamaños de 20-24 nm. Ambos virus se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Realización de los experimentos: Las muestras auténticas del procedimiento intermedio de un lote a gran escala se almacenaron congeladas (≤ -15 °C). Se descongelaron alícuotas de 20 ml antes de los experimentos y se enriquecieron con títulos altos de virus de MuLV o MVM, respectivamente. La etapa del procedimiento b) "Inactivación del virus del eluato de proteína A a pH bajo" (ver Ejemplo 10) se probó solo para MuLV. Debido a la morfología de las cápsidas virales desnudas, los Parvovirus se conocen por su resistencia al tratamiento con pH bajo. Por lo tanto, MVM no se probó para la incubación de pH bajo. Los materiales de partida enriquecidos y las muestras procesadas se analizaron cuantitativamente con el uso de ensayos de infectividad basados en células específicas de virus y qPCR y los factores de reducción se calcularon como valores de \log_{10} . Todos los materiales de prueba se investigaron previamente para determinar la interferencia con los ensayos y las incubaciones de control en paralelo demuestran la estabilidad de los virus durante la duración de los experimentos. Los ensayos de infectividad solo detectan virus infecciosos, mientras que el qPCR comprende tanto virus infecciosos como inactivados. Para cada etapa del procedimiento y el tipo de virus se realizaron corridas duplicadas. En caso de que la muestra procesada no contuviera título viral detectable, el límite de detección calculado del ensayo se usó como título máximo. Los factores de reducción se expresaron después como al menos \log_{10} "≥".

Resultados del estudio de aclaramiento viral: Los resultados de los experimentos individuales se mostraron para cada corrida, etapa y virus en la Tabla 6. La alta reducción de factores de la etapa de limpieza previa en base a una simple cromatografía de intercambio iónico en modo de flujo continuo (resina Nuvia Q) fue sorprendente. Se encontraron los \log_{10} de los factores de reducción de al menos 6,5 a 6,7 para MuLV y 6,6 para MVM. Esta etapa fue la más superior entre las cuatro probadas. Especialmente en caso del difícil MVM de Parvovirus, esto no era de esperar. Además,

mediante el uso de la combinación de cromatografía de intercambio iónico de limpieza previa y una simple etapa de retención de 60 minutos para el eluato de proteína A (pH 3,5), puede obtenerse un factor de reducción acumulativo de al menos 12,3 para virus envueltos tal como MuLV. El log₁₀ acumulativo total de los factores de reducción fueron 21,7 para MuLV y cuatro etapas y al menos 13,3 para MVM y tres etapas.

- 5 Tabla 6: Factores de reducción Log₁₀ de las diferentes etapas del procedimiento para la reducción de dos virus modelo, el virus de la leucemia murina (MuLV) y el virus diminuto de los ratones (MVM). Se realizaron dos corridas por etapa y virus.

Etapas de procedimiento	Corrida 1 / Corrida 2 de MuLV	Corrida 1 / Corrida 2 de MVM
Limpieza previa AEX (Nuvia Q)	≥ 6,74 / ≥ 6,51	6,57 / 6,63
Etapas de retención de eluato de proteína A (pH 3,5)	6,30/5,81	Sin realizar
Pulido CEX (Poros HS)	5,55 / 5,06	1,57 / 1,33
Nanofiltración (Viresolve Pro)	≥ 4,53 / ≥ 4,35	≥ 5,53 / ≥ 5,41
Reducción acumulativa	≥ 21,7 - ≥ 23,1	≥ 13,3 - 13,7

Listado de referencias

- 10 1. F. Bulens y otros, 1991 "Construction and characterization of a functional chimeric murine - human antibody directed against human fibrin fragment-D dimer", Eur. J. Biochem. 195, 235-242
2. R.L. Fahrner y otros, 2001 "Industrial Purification of Pharmaceutical Antibodies: Development, Operation, and Validation of Chromatography Processes", Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 18, 301-327
- 15 3. S.S. Farid, 2009 "Economic Drivers and Trade-Offs in Antibody Purification Processes: The future of therapeutic MAbs lies in the development of economically feasible downstream processes", BioPharm Int. Supplements, 2 de octubre de 2009
4. P. Füglistaller, 1989 "Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices", J. Immunol. Meth. 124, 171-177
5. P. Gagnon, 1996 "Purification Tools for Monoclonal Antibodies", Validated Biosystems, Inc., 1-253
- 20 6. P. Gagnon, 2012, "Technology trends in antibody purification", Journal of Chromatography A, 1221, 57-70
7. T. Ishihara y T. Kadoya , 2007 "Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic" , Journal of Chromatography, 1176(1-2), 149-156
8. B. Kelly y otros, 2009, "Downstream processing of monoclonal antibodies: Current practices and future opportunities", in: Process Scale Purification of Antibodies, edited by U. Gottschalk , John Wiley & Sons, Inc.
- 25 9. H.F. Liu, 2010 "Recovery and purification process development for monoclonal antibody production", mabs Landes Biosciences 2(5), 480-499
10. K. Luhrs y otros, 2009 "Evicting hitchhiker antigens from purified antibodies", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications, 877(14-15), 1543-1552
- 30 11. A.-M. VanDamme y otros, 1990, "Construction and characterization of a recombinant murine monoclonal antibody directed against human fibrin fragment-D dimer", Eur. J. Biochem. 192, 767-775
12. Y. Yigsaw y otros, 2006 "Exploitation of the Adsorptive Properties of Depth Filters for Host Cell Protein Removal during Monoclonal Antibody Purification", Biotechnol. Prog. 22, 288-296
13. EP0345549
14. EP0550400
- 35 15. EP0299746
16. WO03002713
17. WO03041859
18. WO03102132
19. WO2001150110
- 40 20. WO2004076485
21. WO2005016968
22. WO2009058812
23. WO2009138484
24. WO2010141039
- 45 25. WO2011017514
26. WO2011049798
27. WO2011090720
28. WO2011150110
29. WO2013066707
- 50 30. WO2013067301
31. WO9216553
32. WO9222653
33. WO9411026

34. WO9522389

35. WO9729131

36. WO9845331

37. WO2005082483

5 38. WO2006024497

39. WO9118975

40. EMA Committee for proprietary medical products (CPMP) 14 de febrero de 1996, "Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses"; CPMP/BWP/268/95 Apéndice II

10

REIVINDICACIONES

1. El procedimiento de purificación de una inmunoglobulina de una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

5 (a) exponer la muestra a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no está unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

10 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina es unida a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina es unida a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (c) de al menos 10 con respecto a los virus envueltos,

15 en el que la muestra es cosechada en fluido de cultivo celular, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado.

2. El procedimiento para aumentar la seguridad viral en un procedimiento de fabricación de una inmunoglobulina, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

20 (a) exponer una muestra que comprende la inmunoglobulina y al menos una impureza a cromatografía de intercambio iónico y obtener la inmunoglobulina, que no es unida a la resina de cromatografía de intercambio iónico, en el flujo continuo;

25 (b) exponer el flujo continuo obtenido en la etapa (a) ya sea a la cromatografía de afinidad de proteína A, en el que la inmunoglobulina es unida a la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína a partir de la resina de cromatografía de afinidad de proteína A, o a la cromatografía de modo mixto, en el que la inmunoglobulina es unida a la resina de cromatografía de modo mixto, y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de modo mixto;

(c) incubar el eluato obtenido en la etapa (b) a pH bajo de 2,5 a 4,5 durante un tiempo definido;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (c) de al menos 10 con respecto a los virus envueltos

30 en el que la muestra se cosecha en fluido de cultivo celular, sobrenadante de cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular pretratado.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 comprende, además, la siguiente etapa:

(d) exponer el eluato después de la incubación de la etapa (c), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c), a nanofiltración;

35 en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a) y (d) de al menos 10 con respecto a virus no envueltos y/o en el que, el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo de las etapas, (a), (c) y (d) de al menos 15 con respecto a los virus envueltos.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 a 3 comprende, además, la siguiente etapa:

40 (c2) exponer el eluato obtenido en la etapa (c), o una composición derivada del mismo y obtenido después de una o más etapas de procesamiento adicionales realizadas después de la etapa (c), a cromatografía de intercambio catiónico, en la que la inmunoglobulina es unida a la resina de cromatografía de intercambio catiónico y obtener la inmunoglobulina en el eluato eluyendo la proteína de la resina de cromatografía de intercambio catiónico;

en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c) y (c2) de al menos 15 con respecto a los virus envueltos.

45 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c), (c2) y (d) de al menos 20 con respecto a los virus envueltos y/o en el que el procedimiento resulta en un factor de reducción \log_{10} acumulativo para las etapas (a), (c2) y (d) de al menos 12 con respecto a los virus no envueltos.

50 6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cromatografía de intercambio iónico de la etapa (a) es una cromatografía aniónica fuerte que comprende un ligando que es un ligando de cromatografía de intercambio iónico fuerte excepto trimetilamonio metilo unido a una matriz polimérica de metacrilato, en el que el ligando es seleccionado

del grupo que consiste en porciones de aminoetilo cuaternario (QAE), porciones de amonio cuaternario y porciones de trimetilamonio, en el que el ligando es preferentemente trimetilamonio ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$).

Figura 1: Esquema de proceso de procedimientos de purificación convencionales para inmunoglobulinas

Figura 1A: Esquema de proceso universal a gran escala

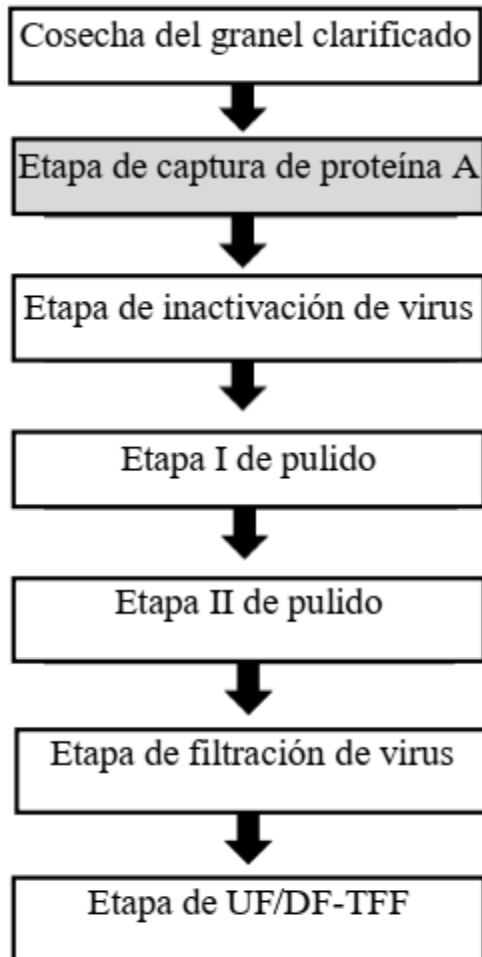


Figura 1: Esquema de proceso de procedimientos de purificación convencionales para inmunoglobulinas

Figura 1B: Esquema de proceso clásico a gran escala

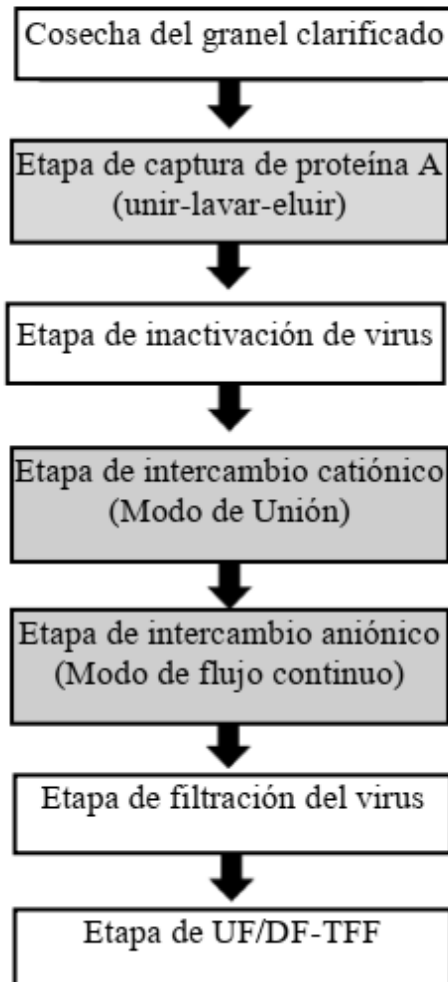


Figura 2: Esquema de proceso ilustrativo de la invención con el uso de etapas de limpieza previas

Figura 2A: Esquema de proceso a gran escala con etapas de limpieza previas y captura de proteína A

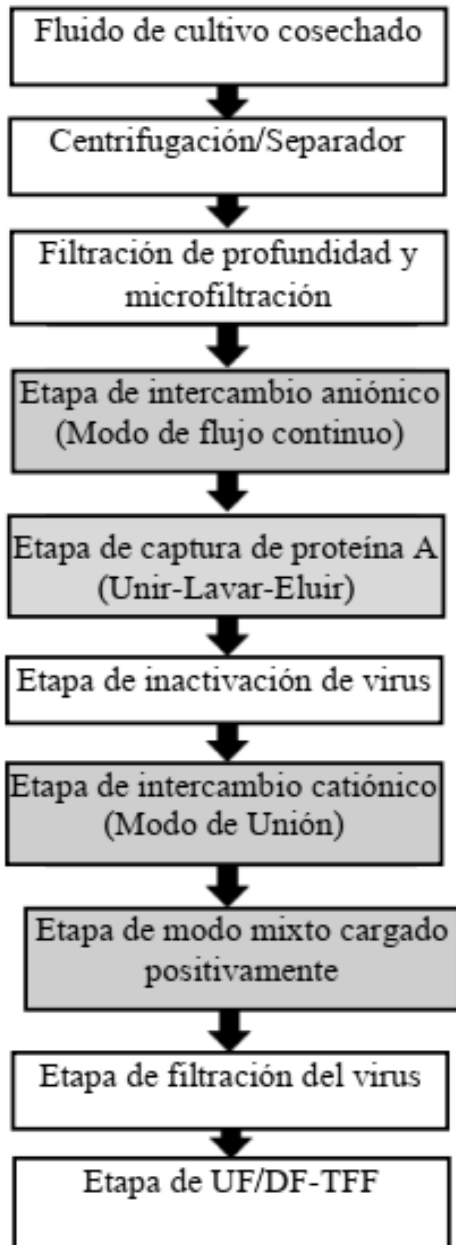


Figura 2: Esquema de proceso ilustrativo de la invención con el uso de etapas de limpieza previas

Figura 2B: Esquema de proceso a gran escala con etapas de limpieza previas, captura de modo mixto, y una cromatografía de afinidad de proteína A.

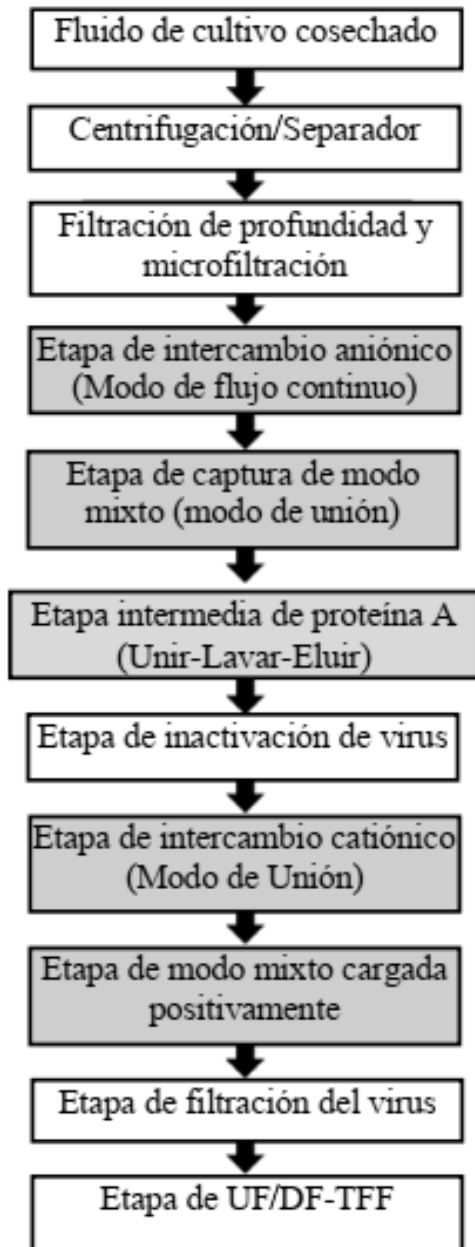


Figura 2: Esquema de proceso ilustrativo de la invención con el uso de etapas de limpieza previas

Figura 2C: Esquema de proceso a gran escala con etapas de limpieza previas, captura de modo mixto, y sin cromatografía de afinidad de proteína A.

