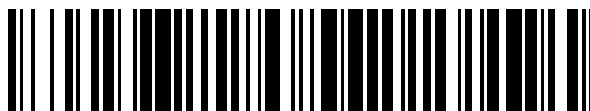


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 829**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/22** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/EP2010/069713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10798291 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2513135**

54 Título: **Procedimiento de purificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

**18.12.2009 EP 09015707**

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

**30.11.2020**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**CHARLTON, ADAM;  
NAPOLI, MARK;  
SMRDELJ, PAUL;  
STOWERS, ANTHONY;  
PIRZAS, VICKY;  
SCHRÖDER, MAGNUS y  
WALKER, IAN**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 796 829 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

Procedimiento de purificación de polipéptidos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos mejorados de purificación de polipéptidos de interés por el aumento de la cantidad de un polipéptido de interés unido a una matriz de intercambio catiónico con relación a la cantidad de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico. Este efecto es logrado mediante la adición de un compuesto químico en el procedimiento que, al ser unido también a la matriz de intercambio iónico, reduce la unión de impurezas más que la unión del polipéptido de interés.

10 La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tópico que se halle fuera del ámbito de las reivindicaciones es proporcionado solo para información.

**Antecedentes de la invención**

15 La purificación económica a gran escala de polipéptidos es un problema de creciente importancia para la industria de la biotecnología. Los polipéptidos son producidos por cultivo celular, usando líneas celulares de mamífero o bacterianas manipuladas genéticamente para producir el polipéptido de interés por la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para ese polipéptido. Debido a que las líneas celulares usadas son organismos vivos, a menudo son alimentadas con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, en algunos casos también suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación del polipéptido de interés deseado de la mezcla de compuestos alimentados a las células y de los subproductos de las células mismas a una pureza suficiente para usar como agente terapéutico humano plantea un desafío formidable.

20 Los polipéptidos terapéuticos recombinantes son producidos comúnmente en varias líneas de células huésped de mamíferos, que incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón embrionario humano (HEK), células de mieloma murino NSO, células de levadura y células bacterianas tal como células de *E. coli* e insectos. Cada línea celular tiene ventajas y desventajas en términos de productividad y las características de los polipéptidos producidos por las células. Las selecciones de líneas celulares de producción comercial a menudo equilibran la necesidad de una alta productividad con la capacidad de brindar los atributos de calidad del producto requeridos para un producto dado. Los avances en las técnicas de fermentación y cultivo celular han aumentado considerablemente las concentraciones de polipéptidos diana en el líquido de cultivo. Este aumento en la eficiencia corriente arriba ha llevado a un cuello de botella en el procesamiento corriente abajo en la etapa de cosecha celular. La cosecha de células, o la clarificación del líquido de cultivo celular cosechado, es un proceso importante en casi todas las purificaciones corriente abajo de productos basados en biotecnología.

35 Una vez que el polipéptido es expresado a los niveles deseados, el polipéptido es retirado de la célula huésped y cosechado. El material particulado suspendido, tal como células, fragmentos de células, lípidos y otras materias insolubles son eliminadas típicamente del líquido que contiene el polipéptido mediante filtración o centrifugación, lo que da como resultado un líquido clarificado que contiene el polipéptido de interés en solución, así como otras impurezas solubles. Los procedimientos para purificación de polipéptidos a partir de restos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión del polipéptido. Se hace que algunos polipéptidos sean secretados directamente de la célula a los medios de crecimiento circundantes; otros se hacen en forma intracelular. Para los últimos polipéptidos, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que puede ser realizada mediante una variedad de procedimientos, que incluyen cizallamiento mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Tal ruptura libera el contenido entero de la célula en el homogenizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se eliminan por centrifugación o por filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con polipéptidos secretados directamente debido a la muerte natural de las células y la liberación de polipéptidos intracelulares de células huésped en el transcurso de la ejecución de producción de polipéptidos.

45 Las impurezas, que incluyen polipéptidos de la célula huésped, variantes del producto, ADN de la célula huésped, moléculas pequeñas, contaminantes relacionados con el procedimiento, endotoxinas, priones y partículas virales deben ser eliminadas. Las técnicas de purificación usadas deben ser escalables, eficientes, rentables, confiables y cumplir con los requerimientos rigurosos de pureza del producto final. Las técnicas actuales de purificación típicamente implican múltiples separaciones cromatográficas. Un procedimiento típico puede incluir todas o al menos algunas de las siguientes etapas: precipitación, diálisis, electroforesis, ultrafiltración, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba. Las etapas convencionales de la cromatografía en columna son eficaces confiables, pero generalmente tienen un bajo rendimiento de producto.

55 Una vez obtenida una solución que contiene el polipéptido de interés, usualmente se intenta su separación de los otros polipéptidos producidos por la célula usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. En algunos casos, el polipéptido deseado es separado de las impurezas por lo que las impurezas se adhieren específicamente a

la columna y el polipéptido de interés no, es decir, el polipéptido de interés está presente en el "flujo continuo" (cromatografía en "modo negativo").

5 Las técnicas de cromatografía explotan las propiedades químicas y físicas de los polipéptidos para lograr un alto grado de purificación. Estas propiedades químicas y físicas típicamente incluyen tamaño, punto isoeléctrico, distribución de  
 10 carga, sitios hidrófobos y afinidad por ligandos (Janson, J. C. and L. Ryden (eds.). (1989) *Polypeptide Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, Inc., New York). Los diversos modos de separación de la cromatografía incluyen: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, fase inversa y de afinidad. La cromatografía de intercambio iónico (IEX), que incluye cromatografía de intercambio aniónico (AEX) y cromatografía de intercambio catiónico (CEX) separa los  
 15 analitos (por ejemplo, polipéptidos) por diferencias de sus cargas superficiales netas. IEX es una herramienta principal para la separación de polipéptidos expresados de desechos celulares y otras impurezas. Hoy, IEX es una de las técnicas más usadas para la purificación de polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas, que ofrece alta resolución y separaciones de grupos con alta capacidad de carga. La técnica es capaz de separar especies moleculares que tienen solo pequeñas diferencias en sus propiedades de carga, por ejemplo, dos polipéptidos que difieren en un aminoácido cargado. Estas características hacen que IEX sea muy adecuada para las etapas de captura, purificación intermedia o pulido en un protocolo de purificación y la técnica se usa desde la purificación y análisis en microescala hasta la purificación de kilogramos de producto.

20 La IEX, denominada por el contraión intercambiable, es un procedimiento aplicable a la purificación de moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas son separadas en base a la interacción electrostática no específica de sus grupos cargados con moléculas cargadas opuestamente unidas a la matriz de soporte de la fase sólida, de este modo se retarda a las moléculas ionizadas que interactúan más fuertemente con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de molécula ionizada, y su afinidad por la matriz, varía de acuerdo con el número de grupos cargados, la carga de cada grupo y la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz de fase sólida cargada. Estas diferencias dan como resultado la resolución de varios tipos de moléculas por IEX. En una purificación de polipéptidos  
 25 típica usando IEX, se aplica una mezcla de muchos polipéptidos derivados de una célula huésped, tal como en el cultivo de células de mamífero, a una columna de intercambio iónico. Después de que se lavan las moléculas de no unión, las condiciones se ajustan, por ejemplo, mediante el cambio de pH, la concentración de contraiones y similares en un modo gradual o en gradiente, para liberar de la fase sólida un polipéptido de interés retenido no específicamente o ionizado en forma retardada y se lo separa de los polipéptidos que tienen diferentes características de carga. AEX implica la competición de una molécula aniónica de interés con iones negativos por la interacción con una molécula cargada positivamente unida a la matriz de fase sólida a pH y bajo las condiciones de un proceso de separación particular. Por el contrario, CEX implica la competición de una molécula catiónica de interés con iones positivos por una molécula cargada negativamente unida a la matriz de fase sólida a pH y bajo las condiciones de un procedimiento de separación particular. La cromatografía de intercambio iónico de modo mixto implica el uso de una combinación de  
 30 medios cromatográficos de cromatografía de intercambio o interacción hidrófoba en la misma etapa. En particular, "modo mixto" se refiere a una matriz de soporte de fase sólida a la que se une covalentemente una mezcla de interacción hidrófoba y restos de intercambio catiónico o de intercambio aniónico.

40 Los polipéptidos dependientes de vitamina K son distinguidos de otros polipéptidos al compartir una característica estructural común en la parte amino terminal de la molécula. La parte de extremo terminal N de estos polipéptidos, también denominada dominio Gla, es rica en el inusual aminoácido ácido gamma-carboxi glutámico que es sintetizado a partir del glutamato en una reacción dependiente de la vitamina K catalizada por la enzima gamma-glutamil carboxilasa. Debido a la presencia de aproximadamente 2 a 12 residuos Gla, el dominio Gla es caracterizado por ser capaz de unir cationes divalentes tales como  $\text{Ca}^{2+}$ . Después de la unión de iones metálicos, estos polipéptidos experimentan cambios conformacionales que se pueden medir mediante varias técnicas, tales como dicroísmo circular y emisión de fluorescencia. En los años 80, ha sido desarrollada una cromatografía de pseudoafinidad específica de conformación usando la propiedad única de los polipéptidos que contienen Gla de experimentar cambios inducidos por el metal en la conformación. La cromatografía de pseudoafinidad difiere de la cromatografía de afinidad convencional en que no hay ligando de afinidad inmovilizado involucrado y se realiza en una matriz cromatográfica convencional (Yan S. B., *J. Mol. Recog.* 1996; 9, 211-218). El polipéptido de Gla puede ser adsorbido en un material de intercambio aniónico mediante la eliminación de iones metálicos divalentes. Posteriormente, la elución se realiza mediante la adición de  $\text{Ca}^{2+}$   
 50 al tampón de elución.

55 En 1986, Bjoern and Thim informaron la purificación del Factor VII recombinante en un material de intercambio aniónico aprovechando la propiedad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  del dominio Gla del Factor VII (Bjoern S. and Thim L., *Research Disclosure*, 1986, 26960-26962). La adsorción se logró en un tampón sin  $\text{Ca}^{2+}$  y la elución del Factor VII fue posible usando un tampón que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  con baja fuerza iónica y en condiciones leves. Yan *et al.* han utilizado el mismo principio para la purificación del polipéptido humano recombinante C (Yan S. B. *et al.*, *Biotechnology*. 1990; 8, 655-661).

60 Los polipéptidos con un dominio GLA comprenden, pero sin limitación, los siguientes polipéptidos: GAS-6, polipéptido S, Factor II (protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, polipéptido C, Factor VII/VIIa, Polipéptido Z, polipéptido 2 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 3 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 4 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 4, polipéptido de Gla de matriz y osteocalcina.

En la técnica, han sido descritos diversos intentos para reducir las impurezas de los polipéptidos de interés.

El documento WO 2009/082443 se refiere a un polímero tal como un polímero soluble capaz de unión irreversible a material particulado insoluble y a un subconjunto de impurezas solubles y también capaz de unión reversible a una o más biomoléculas deseadas en una corriente que contiene material biológico no clarificado y procedimientos para usar dicho material para purificar una o más biomoléculas deseadas de dicha corriente sin la necesidad de clarificación previa.

Solo cuando es precipitado fuera de la solución, el polímero es capaz de unión reversible a una o más biomoléculas deseadas dentro de la corriente (polipéptido, etc.) en un caldo celular no clarificado. El precipitado después puede ser retirado de la corriente, tal como, ser filtrado del resto de la corriente y es recuperada la biomolécula deseada, tal como por elución selectiva del precipitado. Después la corriente es descartada, eliminando con esta la gran mayoría de las impurezas de mezcla, tal como medios de cultivo celular, materiales antiespuma, aditivos y componentes solubles.

El documento WO 2008/122089 desvela la precipitación preferencial de polipéptidos contaminantes, que incluyen los polipéptidos del huésped y los compañeros de fusión escindidos, lo que deja el polipéptido recombinante en solución para la recuperación posterior. Por lo tanto, una solución que comprende tanto el péptido de interés como los polipéptidos contaminantes solubles es sometida a condiciones que producen la precipitación preferencial de los polipéptidos contaminantes (por ejemplo, polipéptidos de células huésped, compañeros de fusión de polipéptidos escindidos y agentes de escisión polipeptídicos tal como proteasas). El precipitado después puede ser separado de la solución que contiene el péptido de interés que después puede ser recuperado de esa solución por técnicas adecuadas, tal como liofilización, etc.

El documento WO 2008/091740 proporciona procedimientos relacionados con el aislamiento y la purificación de polipéptidos derivados de líquidos de cultivo celular por precipitación de un polipéptido con un polielectrolito, tal como un polielectrolito de polianión o con un polielectrolito de policación. La etapa de precipitación puede ser seguida por cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y otras etapas de precipitación.

El documento WO 2008/031020 se refiere a procedimientos de aislamiento de un producto de un fluido de carga que contiene un producto, tal como un anticuerpo, y una o más impurezas por el paso del fluido de carga a través de un medio que une el producto, seguido del paso de al menos una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina a través del medio, y la recolección del producto usando una solución de elución.

El documento WO 2007/117490 se refiere a un procedimiento de producción de una preparación de anticuerpo reducido y polipéptido de células huésped (HCP) a partir de una mezcla que comprende un anticuerpo y al menos un HCP, que comprende una etapa de separación de intercambio iónico en la que la mezcla es sometida a un primer material de intercambio iónico mediante la aplicación de más de 30 gramos de anticuerpo por litro de matriz.

El documento WO 2007/108955 se refiere a la purificación de polipéptidos y polipéptidos, en particular polipéptidos recombinantes tal como anticuerpos monoclonales de una mezcla contaminada que contiene contaminantes tal como polipéptidos de célula huésped y componentes de medios mediante el uso de un procedimiento de purificación de dos etapas que no incluye una etapa de cromatografía de afinidad o una etapa de intercambio de tampón en proceso (por ejemplo, TFF o HPTFF). Más bien, solo son necesarias manipulaciones de pH y/o diluciones desde la primera etapa hasta la segunda etapa.

El documento WO 2007/071768 se refiere a un procedimiento de purificación de un polipéptido de una composición, el procedimiento comprende cargar una solución de dicha composición en una columna de cromatografía líquida de fase inversa y eluir dicho polipéptido de la columna con un tampón que contiene disolvente y una sal, en el que dicha sal no tiene capacidad tamponadora del pH del tampón usado. El procedimiento proporciona además una manera suave de purificar polipéptidos a escala industrial, es decir, un procedimiento en el que una cantidad sustancial del polipéptido cargado sobrevive a las condiciones de funcionamiento y retiene su bioactividad.

El documento WO 2006/110277 se refiere a la purificación de una molécula de interés de al menos un contaminante, tal como polipéptidos de células huésped y otros materiales tal como componentes de medios, mediante el uso de un proceso de purificación de dos etapas que no incluye una etapa de cromatografía de afinidad o una etapa de intercambio de tampón en proceso (por ejemplo, TFF o HPTFF). Más bien, solo son necesarias manipulaciones de pH desde la primera etapa hasta la segunda etapa. Los niveles de CHCP-CP son reducidos a menos de 20 ppm.

El documento WO 2006/067230 se refiere a diversos procedimientos de reducción o incluso eliminación del contenido de polipéptidos contaminantes en composiciones que comprenden un polipéptido de interés dependiente de la vitamina K. En una realización preferente, la proteína S procedente de las células huésped es eliminada.

El documento WO 2003/102132 se refiere a una combinación de un proceso de purificación cromatográfica sin afinidad en combinación con filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (HPTFF) que es capaz de purificar un polipéptido diana, tal como un anticuerpo o una molécula similar a un anticuerpo, a partir de una mezcla que contiene polipéptidos de la célula huésped para que las impurezas del polipéptido de la célula huésped estén presentes en el polipéptido diana purificado final en una cantidad menor que 100 partes por millón (ppm).

El uso de compuestos químicos en IEX que tienen múltiples cargas opuestas a la matriz de intercambio iónico de elección para reducir las impurezas como la proteína de la célula huésped, ácidos nucleicos de la célula huésped, endotoxinas y virus mientras es purificado un polipéptido de interés al mejor leal saber y entender de los inventores aún no ha sido descrito en la técnica anterior.

- 5 AEX ha sido descrito como un medio para reducir las endotoxinas de las proteínas terapéuticas recombinantes (Chen *et al.*, 2009, Protein Expression and Purification, pp 76-81) pero no es mencionado el uso de compuestos químicos cargados positivamente para mejorar la reducción de endotoxinas.

Ha sido demostrado que EGTA es unido a una resina de intercambio aniónico cuando es aplicado en una concentración de 2 mM (Yingst *et al.*, 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1189, pp 113-118).

- 10 Ha sido usado EDTA en una concentración entre 1 mM y 10 mM como un medio para inhibir las proteasas (Charlton A, Methods in Molecular Biology, vol. 241 Affinity Chromatography: Methods and Protocols, Second Edition, Humana Press, pp 211-227) y en una concentración de 10 mM para solubilizar cuerpos de inclusión bacterianos (Ledung *et al.*, 2009, J. Biotechnology, 141, pp 64-72) y para reducir la agregación del polipéptido de interés.

- 15 En IEX, ha sido usado EDTA a una concentración de 1 mM en la purificación de trombospondina en una columna Mono-Q de intercambio aniónico sin hallar cambios en los perfiles de cromatografía, o en una concentración de 5 mM sin dar una razón para su uso en Zhu (Zhu *et al.*, 2009, Process Biochemistry 44 pp 875-879), Chen (Chen *et al.*, 2009, J. Chromatogr. A 1216, pp 4877-4886) sugirieron el uso de EDTA 1 mM para el replegamiento en un polipéptido de interés expresados en forma bacteriana en material de intercambio iónico. Haganika (Haganika *et al.*, 2001, J. Chromatography B, 751, pp 161-167) usó 1 mM en tampones de elución de una matriz de intercambio aniónico también sin explicar los fundamentos para hacerlo. Pittalis *et al.* (Pittalis *et al.*, 1992, J. Chromatography, 573 pp 29-34) usaron concentraciones de EDTA 1,25 mM para equilibrar una matriz de intercambio aniónico. Häberlein (Häberlein, 1991, J. Chromatography, 587, pp 109-115) usó 2 mM de EDTA en la purificación de tiorredoxina usando la matriz de intercambio aniónico Mono-Q. Basta (Basta *et al.*, 1991, J. Immunological Methods, 142, pp 39-44) utilizó un tampón con EDTA 6,5 mM para elución de una proteína del complemento de una columna Mono Q.

- 25 Ninguno de los usos anteriores menciona un efecto positivo sobre el rendimiento de una purificación basada en intercambio iónico de un polipéptido de interés.

- Un documento de Nielsen *et al.* (Nielsen *et al.*, 1985, Veterinary Immunology and Immunopathology, 9, pp 349-359) menciona un efecto beneficioso de la adición de EDTA 1 mM que mejora la separación entre IgG1, IgG2, IgM y albúmina en algunas matrices pero no en todas. Los autores sugirieron un papel para el EDTA que evita la asociación de proteínas, de este modo mejora la unión del ligando de columna.

- 30 En resumen, según el mejor leal saber y entender de los inventores de la presente invención, los niveles más altos de un compuesto químico con carga múltiple además del polipéptido de interés usado hasta ahora en IEX fueron EDTA 6,5 mM en AEX.

### **Sumario de la invención**

- 35 La presente invención es definida por las reivindicaciones y se refiere a procesos mejorados para purificar polipéptidos de interés a partir de mezclas complejas mediante el aumento de la cantidad de un polipéptido de interés unido a una matriz de intercambio catiónico con relación a la cantidad de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico. Este efecto es logrado mediante la adición de un compuesto químico en el proceso que, al unirse también a la matriz de intercambio iónico, reduce la unión de impurezas más que la unión del polipéptido de interés. Las mezclas complejas anteriores pueden resultar de esquemas de producción recombinante o por ejemplo, líquidos corporales humanos o animales, preferentemente soluciones de sangre o plasma.

- 40 Una realización de la invención es el uso de un compuesto químico para reducir las impurezas en un polipéptido de interés en IEX en el que, en las condiciones de purificación seleccionadas, el compuesto químico es unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico, de este modo aumentando la especificidad de unión de un polipéptido de interés mediante la reducción de la cantidad de impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico más que la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio iónico.

El compuesto químico está cargado positivamente y la matriz de intercambio iónico es una matriz de intercambio catiónico.

- 50 En otra realización adicional, la invención se refiere a un proceso de purificación en el que un compuesto químico reduce las impurezas en un polipéptido de interés en IEX en el que, en las condiciones de purificación seleccionadas, el compuesto químico es unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la de la matriz de intercambio iónico, de este modo aumenta la especificidad de unión de un polipéptido de interés mediante la reducción de la cantidad de impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico más que la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio iónico y en el que el compuesto químico se usa a una concentración de al menos 7 mM.

**Descripción detallada de la invención**

A continuación se hace referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención. La invención es descrita junto con las realizaciones enumeradas.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en biología celular, química y biología molecular).

10 A lo largo de esta memoria descriptiva, se entiende que el término "comprender", o variaciones tal como "que comprende" o "comprendiendo", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la referencia a valores numéricos, a menos que se indique lo contrario, se debe considerar que significa "aproximadamente" ese valor numérico. El término "aproximadamente" es usado para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo y el procedimiento empleados para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

15 Los valores de temperatura son presentados para condiciones de presión estándar (1 atm).

20 La invención está basada en el sorprendente hallazgo de que durante el IEX pueden ser añadidos compuestos químicos al fluido de equilibrio y/o al fluido de muestra y/o al fluido de lavado que compiten con la unión de un polipéptido de interés y con la unión de impurezas a la matriz de intercambio iónico. Inesperadamente, ha sido descubierto que, por lo tanto, menos impurezas son unidas a la matriz de intercambio iónico y la relación del polipéptido de interés a una o más impurezas unidas a la matriz durante el IEX aumenta y, por lo tanto, también en el fluido de elución, la relación del polipéptido de interés a una o más impurezas es aumentada.

En una realización la invención se refiere a un procedimiento de purificación de un polipéptido de interés por cromatografía de intercambio de iones en el que es añadido un compuesto químico en una concentración de al menos 7 mM

25 a) a un fluido de equilibrio de la matriz de intercambio catiónico en el que el fluido de equilibrio es ajustado para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de equilibrio sea unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico y/o

30 b) a un fluido de carga que es aplicado a la matriz de intercambio iónico y que comprende el polipéptido de interés en el que el fluido de carga es ajustado para que al menos parte del compuesto químico y al menos parte del polipéptido de interés en el fluido de carga sean unidos a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico y/o

35 c) a un fluido de lavado que es usado para lavar la matriz de intercambio iónico una vez que haya sido unido el polipéptido de interés a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico en el que el fluido de lavado es ajustado para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de lavado es unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico y que al menos al menos parte del polipéptido de interés y al menos parte del compuesto químico ya unidos si son añadidos a la etapa a) o b) continúen unidos a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico

40 de este modo aumentando la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio catiónico con relación a la cantidad de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio catiónico antes de que la matriz de intercambio catiónico sea eluida y de este modo lleva a una relación aumentada del polipéptido de interés a una o más impurezas en el eluato en comparación con el mismo procedimiento en el que el compuesto químico es añadido a una concentración menor que 7 mM.

45 Las concentraciones preferentes del compuesto químico son al menos 7 mM o al menos 10 mM, o al menos 15 mM, o al menos 20 mM o al menos 25 mM o al menos 30 mM o al menos 32 mM o al menos 40 mM o al menos 50 mM.

La matriz de intercambio iónico es un matriz de intercambio catiónico.

En una realización preferente, la carga positiva sobre el compuesto químico está agrupada.

50 Los procedimientos de la invención reducen las impurezas, dichas las impurezas comprenden proteínas de la célula huésped y/o ácidos nucleicos de la célula huésped y/o contaminantes relacionados con el producto y/o virus y/o priones y/o endotoxinas y/o contaminantes relacionados con el procedimiento.

En otra realización de la invención, el polipéptido de interés tiene durante IEX una carga agrupada. En realizaciones preferentes, el polipéptido de interés se puede unir a un ion metálico. En realizaciones aún más preferentes de la

invención, el polipéptido de interés es un polipéptido dependiente de la vitamina K.

La invención también refiere al uso de un compuesto químico para la reducción de impurezas en la purificación de un polipéptido de interés por cromatografía de intercambio de iones en el que es añadido un compuesto químico

5 a) a un fluido de equilibrio de la matriz de intercambio iónico en el que el fluido de equilibrio es ajustado para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de equilibrio sea unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico  
y/o

10 b) a un fluido de carga que es aplicado a la matriz de intercambio iónico y que comprende el polipéptido de interés en el que el fluido de carga es ajustado para que al menos parte del compuesto químico y al menos parte del polipéptido de interés en el fluido de carga sean unidos a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico  
y/o

15 c) a un fluido de lavado que es usado para lavar la matriz de intercambio iónico una vez que haya sido unido el polipéptido de interés a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico en el que el fluido de lavado es ajustado para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de lavado sea unido a la matriz de intercambio iónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio iónico y que al menos parte del polipéptido de interés y al menos parte del compuesto químico ya unidos si son añadidos a la etapa a) o b) continúen unidos a la matriz de intercambio  
20 catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico

de este modo aumentando la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio catiónico con relación a la cantidad de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio catiónico antes de que la matriz de intercambio catiónico sea eluida y de este modo conduciendo a una relación aumentada del polipéptido de interés a una o más impurezas en el eluato en comparación con la realización de la purificación del polipéptido de interés sin añadir el  
25 compuesto químico.

El término "**polipéptido**" como se usa en la presente memoria significa un polímero compuesto por cinco o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

El término "**polipéptido recombinante**" como es descrito en la presente memoria se refiere a un polipéptido producido por procedimientos recombinantes.

30 El término "**aminoácido**" como se usa en la presente memoria abarca tanto aminoácidos naturales como no naturales, este último generalmente es capaz de incorporarse durante la síntesis de polipéptidos recombinantes o resultante de la modificación postraduccional.

El término "**purificado**" o "**aislado**" significa que el polipéptido de interés ha sido retirado de su ambiente natural o huésped, y las impurezas asociadas han sido reducidas o eliminadas para que la molécula en cuestión sea la especie  
35 predominante presente (por ejemplo, siendo en forma molar más abundante que cualquier otra especie individual en la composición/solución). Típicamente, una composición que comprende polipéptidos recombinantes de interés purificados es una en la que el péptido de interés representa al menos 30 por ciento p/p de todas las especies macromoleculares presentes, preferentemente al menos 50, 60, 70 o 75 por ciento p/p. Una composición sustancialmente pura comprenderá más de 80 al 90 por ciento p/p de péptido recombinante de interés.

40 "**Polipéptido de interés**" en el sentido de la invención se refiere a un polipéptido para el cual es deseable purificación a partir de una mezcla de acuerdo con un procedimiento de la presente invención. En general, dicho polipéptido de interés puede ser comercializado y requiere un cierto grado de pureza. Un tipo preferente de polipéptido de interés es un polipéptido terapéutico que puede ser, por ejemplo, un polipéptido secretado. Los polipéptidos terapéuticos incluyen anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, receptores solubles, fusiones del receptor, citocinas,  
45 factores de crecimiento, enzimas, o factores de coagulación, algunos de los cuales se describen con más detalle a continuación en la presente memoria. Los polipéptidos de interés preferentes son polipéptidos dependientes de vitamina K. La lista anterior de polipéptidos es simplemente de naturaleza ejemplar y no pretende ser una mención limitante. Los expertos en la técnica entienden que puede ser usado cualquier polipéptido de acuerdo con la presente invención y que puede ser seleccionado el polipéptido a ser producido según sea necesario.

50 El término "**cromatografía**" se refiere al proceso por el que un polipéptido de interés, en una mezcla, es separado de otros solutos en la mezcla por percolación de la mezcla a través de un adsorbente, que adsorbe o retiene un soluto más o menor fuertemente debido a las propiedades del soluto, tal como pl, hidrofobicidad, tamaño y estructura, en condiciones particulares de tamponado del procedimiento. El uso del término "cromatografía" incluye los tipos de columna y membrana.

55 Los términos "**intercambio iónico**" y "**cromatografía de intercambio iónico (IEX)**" se refieren a un proceso cromatográfico en el que un soluto ionizable de interés (por ejemplo, un polipéptido de interés en una mezcla) interactúa con un ligando cargado de forma opuesta (por ejemplo, mediante unión covalente) unido a un material de

intercambio iónico en fase sólida en condiciones apropiadas de pH y conductividad, de modo que el soluto de interés interactúa de manera no específica con el compuesto cargado más o menor que las impurezas o contaminantes del soluto en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla pueden ser lavados de una columna del material de intercambio iónico o estar unidos o excluidos de la matriz, más rápido o más lento que el soluto de interés. La "cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente una cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía en modo mixto, en la que parte del modo mixto es AEX o CEX.

El término "**material de intercambio iónico**" o "**matriz de intercambio iónico**" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente (es decir, una matriz de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, una matriz de intercambio aniónico). En una realización, la carga puede ser proporcionada mediante la unión de uno o más ligandos cargados (o adsorbentes) a la fase sólida, por ejemplo, por enlace covalente. Alternativamente, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, tal como el caso de la sílice, que tiene una carga negativa general). La carga de muchas matrices de intercambio iónico depende del pH y el experto en la técnica puede ajustar el proceso de purificación de manera de cargar la matriz de intercambio iónico respectiva.

Un "**tampón**" usado en la presente invención es una solución que resiste los cambios en el pH mediante la adición de ácido o base por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Pueden ser empleados diversos tampones en un procedimiento de la presente invención de acuerdo con el pH deseado del tampón y la etapa particular en el procedimiento de purificación [véase Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)]. Los ejemplos no limitantes de componentes de tampón que pueden ser usados para controlar el intervalo de pH deseable para un procedimiento de la invención incluyen tampones de acetato, citrato, histidina, fosfato, amonio tal como acetato de amonio, succinato, MES, CHAPS, MOPS, MOPSO, HEPES, Tris y similares, así como combinaciones de estos TRIS-ácido málico-NaOH, maleato, cloroacetato, formiato, benzoato, propionato, piridina, piperazina, ADA, PIPES, ACES, BES, TES, tricina, bicina, TAPS, etanolamina, CHES, CAPS, metilamina, piperidina, ácido 0-bórico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido butanodioico, ácido di-etilmalónico, glicilglicina, HEPPS, HEPPSO, imidazol, fenol, POPSO, succinato, TAPS, a base de amina, bencilamina, trimetil o dimetil o etil o fenilamina, etilendiamina o mofolina. Pueden estar presentes componentes adicionales (aditivos) en un tampón según sea necesario, por ejemplo, pueden ser usadas sales para ajustar la fuerza iónica del tampón, tal como cloruro de sodio, sulfato de sodio y cloruro de potasio; y otros aditivos tales como aminoácidos (tales como glicina e histidina), caótrofos (tal como urea), alcoholes (tal como etanol, manitol, glicerol y alcohol bencilico), detergentes (ver supra) y azúcares (tales como sacarosa), manitol, maltosa, trehalosa, glucosa y fructosa). Los componentes y aditivos del tampón, y las concentraciones usadas, pueden variar de acuerdo con el tipo de cromatografía practicada en la invención.

Son usados tampones en la presente invención, que incluyen desinfección, equilibrio, carga, lavados poscarga, tampones de elución o remoción. En realizaciones particulares, es añadido un detergente a un tampón de lavado. Los ejemplos de detergentes que pueden ser usados en la invención incluyen, pero sin limitación, polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton™; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurelsulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril, miristil, linoleil o estearil sulfobetaína; lauril, miristil, linoleil o estearil sarcosina; linoleil, miristil o cetil-betaína; lauramidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-sodio o metil oleil-taurato disódico; serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.); Igepal CA-630™, Pluronic™, Triton™, BRIJ, Atlas G2127™, Genapol™, HECAMEG™, LUBROL PX™, MEGA™, NP™, THES-IT™, TOPPS™, CHAPS, CHAPSO, DDMAU, EMPIGEN BB™, ZWITTERGENT™ y C12E8™. El detergente puede ser añadido en cualquier tampón de trabajo y también puede ser incluido en la alimentación que contiene la molécula de interés. Los detergentes pueden estar presentes en cualquier cantidad adecuada para su uso en un proceso de purificación de polipéptidos, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 por ciento a aproximadamente 20 por ciento y típicamente de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 1 por ciento. El pH y la conductividad de los tampones pueden variar de acuerdo con qué etapa del proceso de purificación se use el tampón. Cualquier tampón adecuado a un pH compatible con el ligando seleccionado y la matriz/membrana se puede usar para purificar el polipéptido de interés, tal como los tampones descritos anteriormente. En CEX, el pH del tampón puede estar entre aproximadamente 3 y 10, más preferentemente de aproximadamente pH 4,0 a 9,0; la conductividad puede ser de aproximadamente 0,1 a 40 mS/cm, más preferentemente de aproximadamente una conductividad de 0,5 a 15 mS/cm, de acuerdo con la etapa de purificación y el tampón empleado. En AEX, el pH de los tampones puede ser de aproximadamente 4 a 10, más preferentemente de aproximadamente pH 6,0 a 9,0; la conductividad puede ser de aproximadamente 0,1 a 10,0 mS/cm, más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 5 mS/cm, de acuerdo con la etapa de purificación y el tampón empleado.

El término "**fluido de equilibrio**" se refiere a un líquido que es aplicado a la matriz de intercambio iónico antes de aplicar el líquido que contiene el polipéptido de interés. Es usado un "fluido de equilibrio" para ajustar el pH y la conductividad de la matriz de intercambio iónico antes de cargar la matriz con la mezcla que contiene el polipéptido de interés para la purificación. Los tampones adecuados que pueden ser usados para este propósito son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como los tampones descritos anteriormente, e incluyen cualquier tampón a un pH que sea compatible con la matriz seleccionada usada en la etapa de cromatografía para purificar el polipéptido de interés. En realizaciones particulares, las especies de tampón de equilibrio para AEX o CEX están basadas en



fosfato, carbonato, MES o TRIS. Un tampón preferente para AEX es MES.

El tampón de equilibrio tiene una conductividad y/o pH tal que el polipéptido de interés es unido a la matriz o tal que el polipéptido de interés fluya a través de la columna mientras una o más impurezas son unidas a la columna, según si es usado AEX o CEX. En una realización particular, el equilibrio es completado cuando el pH y la conductividad del medio de cromatografía están dentro de más o menor 0,2 y más o menor 0,4 mS/cm del tampón de equilibrio, respectivamente, más preferentemente dentro de más o menor 0,1 y más o menor 0,2 mS/cm del tampón de equilibrio, respectivamente. En CEX, el pH del tampón de equilibrio es de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, más preferentemente pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, conductividad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mS/cm, más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10,0 mS/cm. En AEX, el pH del tampón de equilibrio es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, más preferentemente pH de aproximadamente 6 a 9, conductividad de aproximadamente 0,1 (WFI) a aproximadamente 10 mS/cm, más preferentemente conductividad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mS/cm. Cuando es usada una matriz de intercambio aniónico POROS® HQ 50, los intervalos de pH preferentes son aproximadamente un pH de 4,5 a 5,5 a una conductividad de aproximadamente 10 a 20 mS/cm o más preferentemente de aproximadamente 15-18 mS/cm respectivamente.

El término "**fluido de carga**" se refiere a un líquido que contiene el polipéptido de interés a aislar y una o más impurezas. El fluido de carga pasa a través de la matriz de intercambio iónico en las condiciones operativas de la invención. El "fluido de carga" se usa para cargar la mezcla que contiene el polipéptido de interés en la columna. Se apreciará que si es usada una membrana como medio de cromatografía, entonces el fluido de carga simplemente se pone en contacto con la membrana de acuerdo con los procedimientos convencionales usados en la técnica. Cualquier solución tamponada apropiada se puede usar como fluido de carga. En realizaciones particulares, el tampón usado para el fluido de carga es un tampón de carbonato, un fosfato, un MES o un TRIS. Los tampones preferentes para el fluido de carga para AEX son a base de carbonato o TRIS. Para AEX o CEX, la conductividad y el pH del fluido de carga son seleccionados para que el polipéptido de interés sea unido al medio de cromatografía mientras la mayoría de los contaminantes puedan fluir a través del mismo. Los tampones adecuados para uso como fluido de carga son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como los descritos anteriormente. Los expertos en la técnica apreciarán que los líquidos de carga para AEX o CEX se pueden usar a pH y conductividades comparables (si no iguales) como se describió anteriormente para los tampones de equilibrio para AEX o CEX. Cuando es usada una matriz de intercambio aniónico POROS® (R) HQ 50, los intervalos de pH preferentes son pH 7,0 a 10 con una conductividad de 10 a 20 mS/cm o más preferentemente de 15 a 19 mS/cm y más preferentemente de 17 a 19 mS/cm respectivamente.

El término "**fluido de lavado**", como se usa en la presente memoria, se refiere a un líquido usado para eliminar impurezas de una matriz de cromatografía (por ejemplo, cuando es usada una columna) antes de eluir el polipéptido de interés. El término "lavado", y sus variaciones gramaticales, es usado para describir el paso de un fluido de lavado adecuado a través o por la matriz de cromatografía. Si es deseable, los líquidos de lavado, equilibrio y carga pueden ser los mismos. El pH y la conductividad del fluido de lavado usado en AEX o CEX es tal que una o más impurezas se eluyen de la matriz mientras la matriz retiene el polipéptido de interés. Si es deseable, el fluido de lavado puede contener un detergente, como se describió anteriormente, tal como un polisorbato. Es importante seleccionar el pH y la conductividad del fluido de lavado para eliminar los HCP y otros contaminantes sin eluir significativamente el polipéptido de interés. El pH y la conductividad del fluido de lavado son seleccionados para que el polipéptido de interés sea retenido en la matriz AEX o CEX utilizada en el procedimiento. Los ejemplos de tampones adecuados para uso en un fluido de lavado son descritos anteriormente. En una realización particular, el tampón de lavado está basado en fosfato, carbonato, MES o TRIS. Un tampón de lavado preferente en AEX es MES.

El pH del fluido de lavado usado en AEX o CEX puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, más preferentemente un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9; y conductividad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mS/cm, más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 mS/cm. Usando una matriz de intercambio aniónico POROS® HQ 50, el pH está preferentemente entre 4,5 y 5,5 y la conductividad es preferentemente de aproximadamente 15 a 25 mS/cm y más preferentemente de 21 a 23 mS/cm e incluso más preferentemente de aproximadamente 22 mS/cm.

El término "**fluido de elución**", como se usa en la presente memoria, se refiere a un tampón usado para eluir el polipéptido de interés de la matriz AEX o CEX. Los términos "eluir" y sus variaciones gramaticales, se refieren al retiro de una molécula, por ejemplo, polipéptido de interés, de un material de cromatografía mediante el uso de condiciones adecuadas, por ejemplo, alteración de la fuerza iónica o pH del tampón que rodea el material de cromatografía, mediante la adición de una molécula competitiva para el ligando, mediante la alteración de la hidrofobicidad de la molécula o mediante el cambio de una propiedad química del ligando (por ejemplo, carga), de modo que el polipéptido de interés no pueda ser unido a la matriz y, por lo tanto, sea eluido de la columna de cromatografía. El pH y la conductividad del tampón de elución son seleccionados para que el polipéptido de interés sea eluido de la matriz AEX o CEX usada en el procedimiento. Los ejemplos de tampones adecuados para uso como tampón de elución son descritos anteriormente. En una realización particular, el tampón de elución está basado en fosfato o TRIS.

El término "**eluato**" se refiere a un líquido que comprende el polipéptido de interés, obtenido tras la unión del polipéptido de interés a un material de cromatografía y la adición de un fluido de elución para eluir el polipéptido de interés.

El pH del tampón de elución usado en AEX o CEX puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, más preferentemente pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9; y conductividad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mS/cm, más preferentemente conductividad de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mS/cm. Usando una matriz de intercambio aniónico POROS® (R) HQ 50 un pH preferente está entre 8,0 y 9,0 y una conductividad preferente es de aproximadamente 17 a 27 mS/cm y más preferente de aproximadamente 22 a 24 mS/cm y aún más preferente de aproximadamente 22,5 a 23 mS/cm.

Como a menudo es el caso, el pH debe ser cambiado entre lavado y elución, o los tampones de lavado o tampón de elución posteriores pueden introducir un compuesto que no es compatible con los tampones de lavado o tampones de equilibrio anteriores. En tales circunstancias, puede ser ventajoso introducir una "etapa de reequilibrio" cuyo propósito es cambiar el pH de la fase móvil mientras se mantiene el estado unido de la proteína de interés, o lavar un compuesto antes de la introducción de su contraparte incompatible.

Si se desea, pueden ser usadas soluciones adicionales para preparar la columna para su reutilización. Por ejemplo, una "solución de regeneración" se puede usar para "retirar" o eliminar contaminantes fuertemente unidos de una columna utilizada en el procedimiento de purificación. Típicamente, la solución de regeneración tiene una conductividad y un pH suficientes para eliminar sustancialmente cualquier impureza y polipéptido de interés restante de la matriz.

En el sentido de la invención, "**ajustar**" significa el establecimiento de los parámetros operativos en una etapa específica del IEX. Esto incluye ajustar un determinado pH, una determinada conductividad, una determinada temperatura, un determinado caudal y el ajuste de otros parámetros de un IEX conocidos por los expertos en la técnica. Los parámetros se establecen para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de equilibrio y/o el fluido de carga y/o el fluido de lavado sean unidos a la matriz de intercambio iónico.

El término "**impureza**" en el sentido de la invención se refiere a cualquier molécula extraña o indeseable presente en una solución tal como un fluido de carga. Una impureza puede ser una macromolécula biológica tal como un ácido nucleico como un ADN o un ARN, o un polipéptido, que no sea el polipéptido de interés que se purifica, que también está presente en una muestra del polipéptido de interés que se purifica. Las impurezas incluyen, por ejemplo, variantes de polipéptidos indeseables, tales como polipéptidos agregados, polipéptidos mal plegados, polipéptidos unidos bajo disulfuro, especies de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular y fragmentos y especies desamidadas; otros polipéptidos de células huésped que secretan el polipéptido que se purifica, ADN de la célula huésped, componentes del medio de cultivo celular, virus, priones, endotoxinas, contaminantes relacionados con el procedimiento que pueden ser moléculas que son parte de un absorbente usado para la cromatografía de afinidad que se lixivia en una muestra durante etapas de purificación anteriores, por ejemplo, polipéptido A; un ácido nucleico; o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

El "**aumento de la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio iónico con relación a una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico**" significa que aumenta la relación del número de moléculas del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio iónico al número de moléculas de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio iónico frente a la relación del número de moléculas del polipéptido de interés al número de moléculas de una o más impurezas en el fluido de carga.

El "**aumento de la relación del polipéptido de interés para una o más impurezas en el eluato**" significa que aumenta la relación del número de moléculas del polipéptido de interés con relación al número de moléculas de una o más impurezas en el eluato frente a la relación del número de moléculas de polipéptido de interés al número de moléculas de una o más impurezas en el fluido de carga.

"**Factor de reducción de CHOP**" significa la relación de la masa de la proteína de interés sobre la masa de CHOP (proteínas de células de ovario de hámster chino) en el fluido de elución, por un lado, sobre la masa de la proteína de interés y por otro lado sobre la masa de CHOP en el fluido de carga. En otras palabras, el factor de reducción de CHOP es:  $(\text{masa}_{\text{Proteína de interés}} / \text{masa}_{\text{CHOP}} \text{ en el fluido de elución}) / (\text{masa}_{\text{Proteína de interés}} / \text{masa}_{\text{CHOP}} \text{ en el fluido de carga})$ .

"**Mejora del factor de reducción de CHOP**" significa el aumento en porcentaje del factor de reducción de CHOP usando un compuesto de acuerdo con la invención en comparación con el factor de reducción CHOP cuando no es añadido ningún compuesto en el mismo procedimiento de purificación en las mismas condiciones que cuando es usado el compuesto. Por ejemplo, la mejora del factor de reducción de CHOP puede ser 11% o 16% o 38% o 52% o 60% o 89% o 150% o 165% o 223% o 265% o 563% o 1200% o 1325% o 1663% cuando son usados diferentes compuestos de acuerdo con la invención con diferentes matrices de intercambio iónico o con diferentes proteínas de interés.

El "**factor de depuración de CHOP**" es la relación de la masa de CHOP en el fluido de carga sobre la masa de CHOP en el fluido de elución.

"**Al menos en parte**" como se usa en la presente memoria, se refiere a un determinado porcentaje de la cantidad total del compuesto químico o el polipéptido de interés que está presente en el respectivo líquido o líquido o está unido a la matriz de intercambio iónico. Este determinado porcentaje es al menos 5%, o al menos 10%, o al menos 20%, o

al menos 30%, o al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97% o al menos 98%, o al menos 99%. Se refiere, por ejemplo, a la cantidad del compuesto químico que es unido a la matriz de intercambio iónico cuando es añadido en el fluido de equilibrio, o a la cantidad del compuesto químico o la cantidad del polipéptido de interés que se une a la matriz de intercambio iónico cuando es añadido a la matriz de intercambio iónico en el fluido de carga.

Una "**matriz de intercambio aniónico**" se refiere a una fase sólida que está cargada positivamente en el momento de la unión a la proteína, por lo que tiene uno o más ligandos cargados positivamente unidos a la misma. Puede ser usado cualquier ligando cargado positivamente unido a una fase sólida adecuada para formar la matriz de intercambio aniónico, tal como grupos amino cuaternarios. Por ejemplo, un ligando usado en AEC puede ser un amonio cuaternario, tal como alquilamina cuaternaria y alquilalcanol amina cuaternaria, o amina, dietilamina, dietilaminopropilo, amino, trimetilamonio, trimetilbencil amonio, dimetiletanolbencilamonio, polietilenolbencilamonio y poliamina. Alternativamente, para AEC, se puede usar una membrana que tiene un ligando cargado positivamente, tal como un ligando descrito anteriormente, en lugar de una matriz de intercambio aniónico.

Las matrices de intercambio aniónico comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, celulosa DEAE, POROS® PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 de Applied Biosystems, MonoQ®, MiniQ, Source™ 15Q y 30Q, Q, DEAE y ANX Sepharose® Flujo rápido, Q Sepharose® alto rendimiento, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE® de GE Healthcare, WP PEI, WP DEAM, WP QUAT de JT Baker, Hydrocell DEAE e Hydrocell QA de Biochrom Labs Inc., UNOsphere™ Q, Macro-Prep® DEAE y Macro-Prep® High Q de Biorad, Ceramic HyperD® Q, cerámica HyperD® DEAE, Q HyperZ®, Trisacryl® M y LS DEAE, Spherodex® LS DEAE, QMA Spherosil® LS, QMA Spherosil® M de Pall Technologies, DOWEX® Malla fina base fuerte Tipo I y Tipo II matriz aniónica y DOWEX® MONO-SPHER E 77, anión base débil de Dow Liquid Separations, Matrex Cellufine A200, A500, Q500 y Q800, de Millipore, Fractogel® EMD TMAE3 Fractogel® EMD DEAE y Fractogel® EMD DMAE de EMD, Amberlite™ intercambiadores aniónicos débiles y fuertes tipo I y II, DOWEX® intercambiadores aniónicos débiles y fuertes tipo I y II, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes Diaion tipo I y II, Duolite® de Sigma-Aldrich, TSK gel® Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl® SuperQ-650S, 650M y 650C3 QAE-550C y 650S, DEAE-650M y 650C de Tosoh, y QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion™ D y Express-Ion™ Q de Whatman.

Puede ser usada una membrana de intercambio aniónico en lugar de una matriz de intercambio aniónico. Las membranas de intercambio aniónico comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, Sartobind® Q de Sartorius, Mustang® Q de Pall Technologies e membrana Intercept™ Q de Millipore.

El término "**compuesto químico**" se refiere a compuestos químicos que generalmente son moléculas pequeñas con un peso molecular menor que 1000 Dalton que se cargan cuando son usadas a un determinado pH en IEX y que compiten a un determinado pH con el polipéptido de interés y con impurezas en la unión a la matriz de intercambio iónico. Los compuestos químicos preferentes con capacidad de unión a iones metálicos son enumerados a continuación.

En el sentido de la invención, el término "**agrupado**" significa una distribución no uniforme de las cargas negativas, lo que significa que hay una concentración local de cargas negativas en el compuesto químico.

Una "**matriz de intercambio catiónico**" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente en el momento de la unión a la proteína, y que tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa que pasa por o a través de la fase sólida. Puede ser usado cualquier ligando cargado negativamente unido a la fase sólida adecuado para formar la matriz de intercambio catiónico, por ejemplo, un carboxilato, sulfonato y otros como se describe a continuación. Las matrices de intercambio catiónico comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, aquellas que tienen un grupo a base de sulfonato (por ejemplo, MonoS®, MiniS, Source™ 15S y 30S, SP Sepharose® Flujo rápido™, SP Sepharose® Alto rendimiento de GE Healthcare, Toyopearl® SP-650S y SP-650M de Tosoh, Macro-Prep® High S de BioRad, Ceramic HyperD® S, Trisacryl® M y LS SP y Spherodex® LS SP de Pall Technologies; un grupo basado en sulfoetilo (por ejemplo, Fractogel® SE de EMD, POROS® (S-10 y S-20 de Applied Biosystems); un grupo basado en sulfopropilo (por ejemplo, TSK Gel® SP 5PW y SP-5PW-HR de Tosoh, POROS® HS-20 y HS 50 de Applied Biosystems); un grupo basado en sulfoisobutilo (por ejemplo, Fractogel® EMD SO3 de EMD); un grupo basado en sulfoxietilo (por ejemplo, SE52, SE53 y Express-Ion™ S de Whatman), un grupo basado en carboximetilo (por ejemplo, CM Sepharose® Flujo rápido de GE Healthcare, Hydrocell CM de Biochrom Labs Inc., Macro-Prep® CM de BioRad, Ceramic HyperD® CM, Trisacryl M CM, Trisacryl LS CM, de Pall Technologies, Matrex Cellufine C500 y C200 de Millipore, CM52, CM32, CM23 y Express - Ion™ C de Whatman, Toyopearl® CM-650S, CM-650M y CM-650C de Tosoh); grupos basados en ácido sulfónico y carboxílico (por ejemplo, BAKERBOND® Carboxy-Sulfon de J.T. Baker); un grupo basado en ácido carboxílico (por ejemplo, WP CBX de JT Baker, DOWEX® MAC-3 de Dow Liquid Separations, Amberlite™ Intercambiadores de cationes débiles, DOWEX® Intercambiador de cationes débiles y Diaion Intercambiadores de cationes débiles de Sigma-Aldrich y Fractogel® EMD COO- de EMD); un grupo basado en ácido sulfónico (por ejemplo, Hydrocell SP de Biochrom Labs Inc., matriz de catión ácido fuerte de malla fina DOWEX® de Dow Liquid Separations, UNOsphere® S, WP Sulfonic de JT Baker, membrana Sartobind® S de Sartorius, Amberlite™ Intercambiador de cationes fuertes, DOWEX® Strong Cation y Diaion Strong Cation Intercambiador de Sigma-Aldrich); y un grupo basado en ortofosfato (por ejemplo, PI 1 de Whatman). Si es deseable, puede ser usada una membrana de intercambio catiónico en lugar de una matriz de intercambio catiónico, por ejemplo, Sartobind® S (Sartorius; Edgewood, NY).

El término "**capacidad para formar iones metálicos complejos**" significa la capacidad de formación de un complejo entre el compuesto químico o el polipéptido de interés y un ion metálico. La formación de un complejo abarca la formación de dos o más uniones separadas entre un ligando polidentado, es decir, el compuesto químico o el polipéptido de interés y un átomo central único. Usualmente, dichos compuestos químicos son compuestos químicos orgánicos y son denominados quelantes, queladores, agentes quelantes o agentes secuestrantes. El compuesto químico forma un complejo quelato con el átomo central único, que puede ser un ion metálico. Los complejos de quelatos se contrastan con los complejos de coordinación con ligandos monodentados, que forman solo un enlace con el átomo central. A modo de ejemplos no limitantes, los siguientes agentes son compuestos químicos con la capacidad de formar complejos iones metálicos de acuerdo con la invención:

- 5 a) compuestos químicos que comprenden un grupo pentaacético y sus diversas sales, como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA o ácido pentético), Pentetide, Ino-1 y Fura-2;
- 10 b) compuestos químicos que comprenden un grupo tetraacético y sus diversas sales, como el ácido 1,2-bis (o-etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus diversas sales (como EDTA diamónico, dihidrato de EDTA dipotásico; EDTA disódico; EDTA trisódico; EDTA tetrasódico y EDTA tetraamónico) y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA);
- 15 c) compuestos químicos que comprenden un grupo tri-acético y sus diversas sales, como el ácido N-(hidroxietil)etilendiamino tri-acético (HEDTA) y ácido nitrilotriacético (NTA);
- c) compuestos químicos que comprenden un grupo tri-acético y sus diversas sales, como el ácido N-(hidroxietil)etilendiamina tri-acético (HEDTA) y (NTA);
- 20 d) compuestos químicos que comprenden un grupo di-acético y sus diversas sales como el ácido amino diacético (IDA), iminodisuccinato tetrasódico, citrato trisódico; y
- e) compuestos químicos que comprenden múltiples grupos amina, como aminoetiletanolamina (AEEA), 2,3-difeniletildiamina, etilendiamina, ácido etilendiamina-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético), ácido etilen-diamina-N,N-disuccínico, tetrahidroxipropil etilendiamina, trietilentetramina y ácido poliaminocarboxílico;
- 25 f) compuestos químicos que comprenden múltiples grupos tiol, como dimeracprol, ácido dimercaptosuccinico (DMSA), ácido dímero-capto-1-propanosulfónico (DMPS), dietilditiocarbamato de sodio;
- g) ácido fosfónico y sus derivados y sus diversas sales, como ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP), ácido dietilentriaminapenta(metilenfosfónico), ácido etilendiaminatetra(metilenfosfónico (EDTMP), ácido etidróico o ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP)).

30 Se debe entender que la inclusión de un determinado compuesto químico como un ion o una determinada sal también abarca el ion en diferentes sales.

Además, los siguientes agentes complejantes son compuestos químicos con la capacidad de complejar iones metálicos en el sentido de la invención. Ácido acetilacetónico, acetilacetona, benzotriazol,2,2'-bipiridina, 4,4'-bipiridina, 1,2-bis (dimetil-arsino) benceno 1,2 bis(dimetil-fosfino) etano, 1,2-bis(difenilfosfino)-etano, benzotriazoles, clatro-quelato, 2,2,2-criptand, catecol, corrol, éter corona, 18-corona-6, criptand, ciclen, ciclodextrinas, deferasirox, deferiprona, deferoxamina, dexrazoxano, diglime, dimetilgloxima, ditioleno, etandiol, ácido etidróico, ferricromo, ácido glucónico, metallacrown, caseína hidrolizada, hexafluoroacetilacetona, penicilamina, fenantrolina, fosfonato, fitoquelatina, porfina, porfirina, pirofosfato, ligando de escorpionato, poli(aspartato) de sodio, terpiridina, tetrafenilporfirina, 1,4,7-triazaciclono-nano, trimetafosfatos trifos, y 1,4,7-tritiaciclono-nano.

40 EDTA es un ácido poliaminocarboxílico con la fórmula  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$ . Su utilidad surge debido a su papel como agente quelante, es decir, su capacidad para "secuestrar" iones metálicos tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Después de estar unidos por EDTA, los iones metálicos permanecen en solución pero presentan una reactividad disminuida. El EDTA se produce como varias sales, especialmente el EDTA disódico y el EDTA disódico cálcico. El peso molecular es 292,24 Da. En química de coordinación,  $\text{EDTA}^{4-}$  es un miembro de la familia de ligandos del ácido poliaminocarboxílico.  $\text{EDTA}^{4-}$  generalmente es unido a un catión metálico a través de sus dos aminas y cuatro carboxilatos. Muchos de los compuestos químicos de coordinación resultantes adoptan geometría octaédrica. EDTA también es capaz de unirse a cargas catiónicas de matrices AEX.

50 Los procesos utilizan el compuesto químico como EDTA en una concentración entre 7 mM y una concentración en la que la conductividad que el compuesto químico introduce en el fluido de equilibrio o el fluido de muestra o el fluido de lavado es tan alta que ya no tiene lugar la unión del polipéptido de interés. El experto en la materia puede determinar fácilmente esta concentración máxima de la cantidad química para cada combinación individual de un compuesto químico determinado y un polipéptido de interés determinado. Para EDTA, la concentración preferente para los procedimientos es al menos 7 mM o al menos 10 mM, o al menos 15 mM, o al menos 20 mM o al menos 25 mM o al menos 30 mM o al menos 32 mM o al menos 40 mM o al menos 50 mM. Para EDTA el intervalo en el cual la conductividad del fluido de equilibrio, o el fluido de muestra o el fluido de lavado es demasiado alta para la unión eficiente del polipéptido de interés se inicia a aproximadamente 200 mM. Por lo tanto, los procesos preferentes son el

uso hasta 200 mM EDTA, o hasta 190 mM, o hasta 180 mM o hasta 170 mM o hasta 160 mM o hasta 150 mM o hasta 140 mM o hasta 130 mM. Se debe entender que los intervalos inferiores descritos para la concentración de EDTA se pueden combinar con la concentración superior descrita para formar intervalos de concentración preferentes, como 7 mM a 200 mM, 7 mM a 190 mM, 7 mM a 180 mM o 10 mM a 200 mM, o 10 mM a 190 mM, o 10 mM a 180 mM, o 15 mM a 200 mM o 15 mM a 190 mM o 15 mM a 180 mM.

También son especialmente preferentes los procedimientos que usan ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) como compuesto químico.

Los ejemplos de compuestos aniónicos que pueden ser usados de acuerdo con la invención en la purificación de un polipéptido de interés por CEX son aminas primarias y polímeros de aminoácidos catiónicos, tales como tetraetilenpentamina (TEPA), dipicolilamina (DPA), poli-lisina., poli-arginina y polihistidina.

Los polipéptidos preferentes para purificar por los procesos de la invención están cargados y tienen cargas agrupadas preferentemente o comprenden grupos funcionales como se enumeran anteriormente para los compuestos químicos, como los grupos amina o tiol, que pueden contribuir a una fuerte unión al matriz de intercambio iónico. Preferentemente, estos grupos funcionales también están agrupados.

El término "**polipéptido de la célula huésped**", o "**HCP**", se refiere a cualquiera de los polipéptidos derivados del metabolismo (intra y extracelular) de la célula huésped que expresa el polipéptido diana, que incluye los polipéptidos expresados del genoma de células huésped o polipéptidos que se expresan de forma recombinante y que no se consideran el polipéptido diana. La célula huésped puede ser cualquier célula que sea capaz de expresar el polipéptido diana, en particular las líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, líneas celulares CHO y mieloma murino tales como NSO), líneas celulares bacterianas, insectos, plantas y levadura. En una realización particular de la invención, el HCP es un "polipéptido de células de ovario de hámster chino", o "CHOP", que se refiere a cualquiera de los polipéptidos de células huésped ("HCP") derivados de un cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO"). El HCP está presente generalmente como una impureza en un medio de cultivo celular o lisado [(por ejemplo, un líquido de cultivo celular cosechado ("HCCF")), que contiene el polipéptido de interés. La cantidad de HCP presente en una mezcla que comprende un polipéptido del interés proporciona una medición del grado de pureza para el polipéptido de interés. Típicamente, la cantidad de HCP en una mezcla de polipéptidos se expresa en partes por millón con relación a la cantidad del polipéptido de interés en la mezcla. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un eluato que contiene un producto tiene HCP presentes en menos de 100 ppm, o menor de 90 ppm, o menor de 80 ppm, o menor de 70 ppm, o menor de 60 ppm, o menor de 50 ppm, o menor de 40 ppm, o menor de 30 ppm, o menor de 20 ppm, o menor de 10 ppm o menor de 5 ppm.

La composición de HCP es extremadamente heterogénea y depende del producto polipeptídico y del procedimiento de purificación utilizado. Antes de cualquier aprobación de comercialización de un producto biológico para uso terapéutico, el nivel de polipéptidos contaminantes (tal como HCP) en el producto se debe medir cuantitativamente de acuerdo con las pautas de ICH y FDA.

Los polipéptidos de la célula huésped como se discutió anteriormente pueden ser polipéptidos humanos si es usada una línea celular humana para la producción del polipéptido de interés o polipéptidos no humanos, si es usada una línea celular no humana para la producción del polipéptido de interés. En un aspecto de la invención, el contaminante del polipéptido es un polipéptido de la célula huésped, tal como un polipéptido dependiente de la vitamina K. Una clase particularmente relevante de polipéptidos de células huésped son los polipéptidos que contienen dominios Gla tales como GAS-6, polipéptido S, Factor II (protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, polipéptido C, Factor VII/VIIa, polipéptido Z, polipéptido de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana 1, polipéptido de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana 2, polipéptido de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana 3, polipéptido de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana 4, polipéptido Gla de matriz y osteocalcina.

Como se mencionó anteriormente, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es típicamente un factor de coagulación dependiente de la vitamina K seleccionado de polipéptidos de Factor VII, polipéptidos de Factor IX, polipéptidos de Factor X y polipéptido activado C. En una realización más particular, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es un polipéptido del Factor IX. En otra realización adicional particular, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es un polipéptido de Factor VII. En otra realización particular, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es un polipéptido de Factor X.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de separación de contaminantes de polipéptidos no humanos del polipéptido dependiente de la vitamina K humana. En un aspecto de la invención, los contaminantes de polipéptidos no humanos también son polipéptidos dependientes de vitamina K. En otro aspecto más, los contaminantes de polipéptidos no humanos son polipéptidos de hámster.

El término "**partes por millón**" o "**ppm**" es usado indistintamente en la presente memoria para referirse a una medida de pureza del polipéptido de interés purificado por un procedimiento de la invención. Las unidades ppm se refieren a la cantidad de HCP en nanogramos/mililitro por polipéptido de interés en miligramos/mililitro, en que los polipéptidos están en solución (es decir, como se describe en un Ejemplo infra, HCP ppm = (CHOP ng/ml)/(polipéptido de interés mg/ml)). Cuando los polipéptidos se secan, tal como por liofilización, ppm se refiere a (HCP ng)/(polipéptido de interés

mg).

Existen diferentes procedimientos para determinar los niveles de proteína de la célula huésped (HCP). La falla de identificación y eliminación suficiente de los HCP del polipéptido de interés, puede llevar a una reducción de la eficacia y/o a reacciones adversas del paciente. Un procedimiento es un "ELISA HCP" que se refiere a un ELISA en el que el segundo anticuerpo usado en el ensayo es específico de los HCP producidos a partir de células, por ejemplo, células CHO, usadas para generar el anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede producir de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede producir usando HCP obtenidos mediante ejecuciones simuladas de producción y purificación, es decir, se usa la misma línea celular usada para producir el anticuerpo de interés, pero la línea celular no es transfectada con ADN de anticuerpo. En un ejemplo de realización, el segundo anticuerpo se produce usando HCP similares a las expresadas en el sistema de expresión celular de elección, es decir, el sistema de expresión celular usado para producir el anticuerpo diana.

Generalmente, el ELISA HCP comprende intercalar una muestra líquida que comprende HCP entre dos capas de anticuerpos, es decir, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo. La muestra es incubada durante ese tiempo, los HCP de la muestra son capturados por el primer anticuerpo, por ejemplo, anti-CHO de cabra, purificado por afinidad (Cygnus). Es añadido un segundo anticuerpo marcado específico para los HCP producidos a partir de las células usadas para generar el anticuerpo, por ejemplo, HCP anti-CHO biotinilado, y es unido a los HCP dentro de la muestra. La cantidad de HCP contenida en la muestra se determina usando la prueba adecuada basada en la marca del segundo anticuerpo. El ELISA de HCP se puede usar para determinar el nivel de HCP en una composición de anticuerpos, tal como un eluato o flujo continuo obtenido usando el proceso descrito en la sección III anterior. La presente invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo, en la que la composición tiene un nivel no detectable de HCP de acuerdo con lo determinado por un ensayo de inmunoabsorbancia enzimática ("ELISA") de HCP.

El término "**ácidos nucleicos de la célula huésped**" significa cualquier polinucleótido, por ejemplo, ARN o ADN presentes en la célula huésped que expresa el polipéptido de interés. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o cadena doble.

El término "**contaminantes relacionados con el producto**" se refiere a productos de degradación, agregados o formas mal plegadas o desnaturalizadas de otro modo del polipéptido de interés, que son indeseables y se deben eliminar del polipéptido de interés puro final. Un producto de degradación de particular interés que se puede reducir es FIXalfa en la purificación de FIX.

El término "**virus**" incluye virus de ADN o ARN. Estos virus pueden estar envueltos o no envueltos por una membrana de fosfolípidos.

El término "**priones**" se refiere a proteínas erróneamente plegadas transmisibles. Estas proteínas erróneamente plegadas pueden hacer que las versiones plegadas correctamente de la proteína se vuelvan erróneamente plegadas.

El término "**endotoxinas**" significa lipopolisacáridos derivados de las membranas celulares.

El término "**impurezas relacionadas con el procedimiento**" se refiere a cualquier molécula, especialmente proteínas añadidas en el procedimiento. A modo de ejemplo no limitativo, tales impurezas relacionadas con el procedimiento pueden ser proteína A, polisorbato-80, fosfato de tri-n-butilo o ligandos lixiviados, por ejemplo, de anticuerpos monoclonales de una purificación de inmunoafinidad corriente arriba.

El término "**fluido de cultivo celular cosechado**" significa fluido de cultivo celular procariota o eucariota del que han sido eliminadas las células, por medios que incluyen centrifugación o filtración. El cultivo celular es el procedimiento mediante el cual son cultivadas células procariotas o eucariotas en condiciones controladas.

El término "**cultivo celular**" se refiere al cultivo de células derivadas de eucariotas multicelulares, que incluyen células animales o procariotas monocelulares, que incluyen bacterias y levaduras. Los cultivos de células eucariotas incluyen células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino, hibridomas y células de insectos. Con un recipiente de cultivo celular adecuado, se pueden obtener polipéptidos secretados a partir de células dependientes de anclaje o líneas celulares en suspensión. Los cultivos de células de mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO).

El término "**reducido**" se refiere al decrecimiento o disminución de la cantidad de una sustancia. Una preparación reducida incluye una preparación que tiene menos sustancia, tal como los HCP, con relación a una cantidad inicial. En una realización, la sustancia es una impureza o contaminante. En una realización, el término "reducido" significa sustancialmente menos de la sustancia. En otra realización, el término "reducido" significa que no hay cantidad de la sustancia. En una realización, ninguna cantidad de una sustancia incluye "cantidad no detectable" usando los ensayos descritos en la presente memoria.

El término "**sustancialmente libre**" incluye ninguna cantidad de una sustancia, pero también puede incluir una cantidad mínima de una sustancia. En una realización, ninguna cantidad de una sustancia incluye "cantidad no detectable" usando los ensayos descritos en la presente memoria.

El término "**detergente**" se refiere a tensioactivos iónicos, zwitteriónicos y no iónicos, que son útiles para evitar la agregación de polipéptidos y evitar la interacción o unión no específica de contaminantes al polipéptido de interés, y pueden estar presentes en diversas concentraciones.

5 Una solución de "**desinfección**" es usada típicamente para limpiar la matriz utilizada en la cromatografía en columna mediante la eliminación de cualquiera de los contaminantes unidos, por ejemplo, los de origen biológico, antes del procedimiento de purificación. Puede ser usado cualquier tampón deseable para este propósito, siempre que sea compatible con la columna y matriz particulares seleccionadas de acuerdo con un procedimiento de la invención. Preferentemente, el pH de la solución de desinfección es alto, por ejemplo, pH 10 o mayor, más preferentemente pH 11 o mayor, y aún más preferentemente pH 12 o mayor; alternativamente, el pH de la solución de desinfección puede ser bajo, por ej., pH 4 o menor, más preferentemente pH 3 o menor. En una realización particular, una matriz usada en un procedimiento de la invención es limpiada usando una solución de desinfección que incluye NaOH 1 N, pH mayor que 12.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "**conductividad**" se refiere a la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos a una temperatura particular. Una corriente fluye por transporte de iones en solución. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. En un procedimiento de la presente invención, la temperatura a la que normalmente se realiza la purificación puede ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 37 grados centígrados, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 grados centígrados dentro de los intervalos de pH especificados.

20 La unidad de medición de la conductividad es miliSiemens por centímetro (mS/cm), y puede ser medida usando un medidor de conductividad estándar. La conductividad de una solución puede ser alterada mediante el cambio de la concentración de iones de la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponador y/o la concentración de una sal (por ejemplo, NaCl o KCl) en la solución se puede alterar para lograr la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal se modifica para lograr la conductividad deseada como se describe en el Ejemplo a continuación. La conductividad del líquido respectivo no es una característica esencial de la invención. El experto en la técnica puede determinar con experimentos estándar las conductividades en el fluido de equilibrio, el fluido de carga o el fluido de elución que permiten que tanto el polipéptido de interés como el compuesto químico se unan a la matriz de intercambio iónico.

30 El "**pI**" o "**punto isoeléctrico**" de un polipéptido se refiere al pH al cual la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI se puede calcular de acuerdo con diversas metodologías convencionales, por ejemplo, a partir de la carga neta de los residuos de aminoácidos y/o ácido siálico en el polipéptido o mediante el isoelectroenfoque.

#### **Polipéptidos de interés dependientes de la vitamina K**

35 La presente invención se refiere en un aspecto amplio a la purificación de un polipéptido de interés dependiente de la vitamina K y a composiciones purificadas particulares que comprenden dichos polipéptidos. El término "de interés" se aplica en la presente memoria como un indicador de la especie particular (un polipéptido dependiente de la vitamina K) que es relevante para obtener en la forma más pura, por ejemplo, con el propósito de usar el polipéptido dependiente de la vitamina K en un contexto terapéutico.

40 Los procedimientos descritos en la presente memoria en principio se pueden aplicar a la purificación de cualquier polipéptido dependiente de la vitamina K que comprende, pero sin limitación, GAS-6, polipéptido S, Factor II (protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Polipéptido C, Factor VII/VIIa, polipéptido Z, polipéptido 1 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 2 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 3 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido 4 del ácido gamma-carboxiglutámico de transmembrana, polipéptido de Gla de matriz y osteocalcina), en particular factores de coagulación dependientes de la vitamina K seleccionados de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y polipéptido activado C. En una realización particular, el procedimiento se usa para la purificación de polipéptidos de interés dependientes de vitamina K recombinantes producidos en condiciones de cultivo celular, en particular cultivos celulares no humanos.

En una realización particular, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es un polipéptido de Factor IX, tal como FIX o FIXa.

50 Como se usa en la presente memoria, los términos "polipéptido del Factor IX" y "polipéptido de FIX" significan cualquier polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del Factor IX humano de tipo salvaje (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos desvelada en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.994.37 o la Patente europea Núm. EP 0107278), variantes de los mismos, así como polipéptidos relacionados con el Factor IX, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII. Esto incluye variantes de Factor IX, polipéptidos relacionados con Factor IX, derivados de Factor IX y conjugados de Factor IX que exhiben una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada con relación al Factor IX humano de tipo salvaje.

El FIX humano, un miembro del grupo de polipéptidos dependientes de la vitamina K, es una glicoproteína de cadena

simple con un peso molecular de 57 kDa, que es secretada por las células hepáticas en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 415 aminoácidos. Contiene 12 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico localizados en el dominio Gla N-terminal del polipéptido. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Después del dominio Gla hay dos dominios del factor de crecimiento epidérmico, un péptido de activación y un dominio de serina proteasa de tipo tripsina. Otras modificaciones postraduccionales de FIX incluyen hidroxilación (Asp 64), N-(Asn157 y Asn167), así como glicosilación de tipo O (Ser53, Ser61, Thr159, Thr169 y Thr172), sulfatación (Tyr155) y fosforilación (Ser158).

FIX es convertido en su forma activa, Factor IXa, por proteólisis del péptido de activación en Arg145-Ala146 y Arg180-Val181, lo que lleva a la formación de dos cadenas de polipéptidos, una cadena liviana de extremo terminal N (18 kDa) y una cadena pesada de extremo terminal C (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. La escisión por activación del Factor IX se puede lograr *in vitro*, por ejemplo, mediante el Factor XIa o Factor VIIa/TF. El Factor IX está presente en el plasma humano en una concentración de 5-10  $\mu\text{g/ml}$ . Se halló que la vida media plasmática terminal del Factor IX en los seres humanos era de aproximadamente 15 a 18 horas (White GC *et al.* 1997. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost.* 78: 261-265; Ewenstein BM *et al.* 2002. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B. *Transfusion* 42:190-197).

En otra realización, la invención se refiere a procedimientos de separación de un FIX de longitud completa de FIXalfa. FIXalfa es un producto de descomposición proteolítica específico que resulta de la escisión de FIX solo en el sitio de activación Arg145 - Ala146. Esta forma de proteína no es separable por SEC, ya que permanece unida mediante enlaces disulfuro y, por lo tanto, es un problema específico en la purificación de FIX. En una realización de la invención, la cantidad de FIXalfa está reducida frente a la cantidad de FIX intacta mediante el uso de los procedimientos de la invención.

En otra realización particular, el polipéptido de interés dependiente de la vitamina K es un polipéptido de Factor VII, tal como un polipéptido relacionado con Factor VII, o derivados del Factor VII, o un conjugado de Factor VII, en particular un polipéptido de Factor VII humano, en particular el Factor VII de tipo salvaje humano o el Factor VIIa de tipo salvaje humano.

Como se usa en la presente memoria, los términos "polipéptido del Factor VII" y "polipéptido FVII" significan cualquier polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos 1-406 del Factor VIIa humano de tipo salvaje (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos desvelada en la Patente de los Estados Unidos Núm., 4.784.950), variantes de los mismos, así como polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII. Esto incluye variantes del Factor VII, polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII que exhiben una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada con respecto al Factor VIIa humano de tipo salvaje.

El FVII es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, que es secretada por las células del hígado al torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 406 aminoácidos. Contiene 10 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico (posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35) localizados en el dominio Gla de extremo terminal N de la proteína. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Dos dominios de factor de crecimiento epidérmico se ubican en forma de extremo terminal C al dominio Gla seguidos por un dominio de serina proteasa de tipo tripsina. Otras modificaciones postraduccionales de FVII incluyen hidroxilación (Asp 63), N-(Asn145 y Asn322), así como la glicosilación de tipo O (Ser52 y Ser60).

El FVII es convertido en su forma activa Factor VIIa por proteólisis del enlace peptídico único en Arg152-Ile153 que lleva a la formación de dos cadenas de polipéptidos, una cadena liviana de extremo terminal N (24 kDa) y una cadena pesada de extremo terminal C (28 kDa), que se mantienen unidos por un puente disulfuro. A diferencia de otros factores de coagulación dependientes de la vitamina K, no se ha descrito ningún péptido de activación, que se escinde durante la activación de estos otros factores de coagulación dependientes de la vitamina K para FVII. El sitio de escisión Arg152-Ile153 y algunos aminoácidos corriente abajo muestran homología con el sitio de escisión de activación de otros polipéptidos dependientes de vitamina K.

### **Expresión recombinante**

La producción recombinante de polipéptidos puede ser lograda usando diversas técnicas. Típicamente, la secuencia de polinucleótidos de interés es clonada en un "vector de expresión". El vector puede ser un vector plasmídico, un vector viral o cualquier otro vehículo adecuado adaptado para la inserción de secuencias extrañas, su introducción en células eucariotas o procariontes y la expresión de las secuencias introducidas según sea adecuado. Típicamente, el vector incluye secuencias de control transcripcional/traduccionales requeridas para la expresión del polipéptido de fusión en una célula huésped, tal como un promotor, un sitio de unión a ribosomas, un codón de iniciación, un codón de detención, opcionalmente una secuencia de operador y posiblemente otras secuencias reguladoras tal como potenciadores.

Los vectores de expresión recombinantes adecuados para producir los polipéptidos recombinantes de la invención incluyen típicamente una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se usarán para la expresión, unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión



para expresar. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped para transformar y el nivel de expresión del péptido deseado. El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los procedimientos y materiales para preparar vectores recombinantes, transformar células huésped usando vectores de replicación y expresar polipéptidos extraños biológicamente activos son generalmente bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos recombinantes de la invención también se pueden producir en un sistema libre de células.

Los polipéptidos recombinantes de interés también pueden ser diseñados para ser secretados extracelularmente y/o se transportados a ubicaciones específicas en la célula. Por ejemplo, el péptido recombinante se puede diseñar para ser transportado a una organela, tales como plástidos o vacuolas en una célula de planta u otro tipo de cuerpo celular no de membrana o inclusión, tal como los que existen en los procariotas. Los procedimientos empleados para dirigir péptidos a ubicaciones extracelulares o celulares son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos recombinantes y/o constructos de vector se pueden diseñar para incluir secuencias de direccionamiento y/o modificaciones pos-traducción que permitan el transporte celular. Dicho transporte puede ser postraduccional o cotraduccional.

Los polipéptidos de interés recombinantes también pueden ser producidos en una organela o ubicación celular particular, tal como un plástido. Los expertos en la técnica conocen procedimientos adecuados para lograr la expresión en la ubicación deseada e implican, por ejemplo, el diseño del péptido y/o vectores recombinantes con promotores adecuados y otras secuencias de control 5' y 3' según se requiera.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tal como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, una serie de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y útiles en la presente memoria, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*; tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped de insectos permisivas provenientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-I del NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden usar como virus en la presente memoria de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células de planta de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden ser usados como huéspedes.

Las células huésped de mamífero preferentes para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen el ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *PNAS USA* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como es descrito en Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos son introducidos en células huésped de mamífero, los anticuerpos son producidos mediante el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CVI de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELGA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped son transformadas con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción y cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

**Composiciones farmacéuticas**

Los polipéptidos obtenidos usando el proceso de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un individuo. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Como se usa en la presente memoria, "**portador farmacéuticamente aceptable**" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo.

- 15 Los polipéptidos de interés obtenidos usando el proceso de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un individuo. Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tal como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo.

- 25 La solución puede ser tratada para eliminar parte o la totalidad del disolvente, por ejemplo, por secado por congelación, secado por pulverización, liofilización, o para recuperar de otro modo el péptido recombinante de la solución. El péptido recombinante después se puede almacenar, por ejemplo, como una formulación líquida o preparación sólida. La formulación deseada del producto final se determinará mediante la aplicación corriente abajo requerida del péptido.

- 30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos de la invención pueden ser halladas en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosis líquidas, semisólidas y sólidas, tal como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferente depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferentes típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles. El modo preferente de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferente, el anticuerpo es administrado por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferente, el anticuerpo es administrado por inyección intramuscular o subcutánea

- 35 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones son preparadas mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

- 40 Los polipéptidos obtenidos usando los procedimientos de la presente invención pueden ser administrados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferente es la inyección subcutánea. En otra realización, la administración es realizada mediante inyección intravenosa o infusión. Como apreciarán los expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán de acuerdo con los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protege el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tal como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están

patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una **"cantidad terapéuticamente efectiva"** o una **"cantidad profilácticamente efectiva"** de un polipéptido de interés purificado usando un procedimiento de acuerdo con la invención. Una **"cantidad terapéuticamente efectiva"** se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede variar de acuerdo con factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de los polipéptidos para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una **"cantidad profilácticamente efectiva"** se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que es usada una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede ser administrado un bolo único, pueden ser administradas diversas dosis divididas con el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de unidad de dosis como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos para tratar; cada unidad comprende una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosis de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

También son descritas en la presente composiciones farmacéuticas empacadas, artículos de fabricación o kits que comprenden el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, obtenidos usando el procedimiento de la invención. El artículo de fabricación puede comprender un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, obtenido usando el procedimiento de la invención y el material de empaque. El artículo de fabricación también puede comprender una marca o un prospecto que indica que la formulación o composición que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene un nivel reducido de HCP.

La presente invención es descrita ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos se refieren a figuras:

#### **Descripción de las figuras**

- Figura 1: Depuración de CHOP en varias concentraciones de EDTA
- Figura 2: SEC analítica del eluato de los procedimientos de control y con EDTA
- Figura 3: Nivel de Factor IX alfa en el eluato de los procedimientos de control y que contienen EDT
- Figura 4: Depuración de CHOP en la fabricación a gran escala
- Figura 5: Factor de reducción de CHOP para diferentes compuestos en POROS® 50 HQ.
- Figura 6: Factor de reducción de CHOP para diferentes matrices de intercambio aniónico usando EDTA.
- Figura 7: Factor de reducción de CHOP para POROS® 50 HQ y EDTA solo en tampón de lavado poscarga.
- Figura 8: Factor de reducción de CHOP para anticuerpo monoclonal en una matriz de intercambio aniónico Fractogel® EMD TMAE (M) usando EDTA.
- Figura 9: Factor de reducción de CHOP para anticuerpo monoclonal en una matriz de intercambio catiónico Fractogel® EMD SO3 (M) usando DPA.
- Figura 10: Factores de reducción CHOP para rVIIa-FP en POROS® 50 HQ usando diferentes concentraciones de EDTA versus control sin adición de EDTA

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo de referencia 1: procedimiento de purificación mediada con EDTA de rIX-FP en POROS® - HQ**

rIX-FP es expresada como una proteína de fusión de albúmina en células CHO con FIX fusionado en su extremo terminal C a albúmina humana como es descrito en el documento WO2007/144173. Después de la fermentación, el cultivo es sometido a filtración a través de Cuno Zeta 60SP seguido de 10SP. Después, el fluido de cultivo celular clarificado es procesado mediante el procedimiento de intercambio aniónico "con EDTA" de acuerdo con la invención

o por medio del procedimiento de "control".

#### **Ejemplo 1a: procedimiento de control**

El fluido de cultivo celular clarificado (fluido de carga) es aplicado a una columna de intercambio aniónico empaquetada con POROS® HQ 50 (Applied Biosystems) a 380 cm/h. Esta columna había sido equilibrada previamente mediante la aplicación de tres volúmenes de columna de un fluido de equilibrio (MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0) a 380 cm/h. La conductividad estaba en el intervalo de 16 a 18 mS/cm. Después de aplicar el fluido de cultivo celular clarificado, cualquier material no unido es lavado de la columna mediante la aplicación de tres volúmenes de columna a un fluido de lavado (MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0) a 380 cm/h. Después se lavaron contaminantes adicionales, menos fuertemente unidos que el rIX-FP, de la columna mediante la aplicación de cinco volúmenes de columna de un fluido de lavado (MES 50 mM, NaCl 195 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 5,0) a 380 cm/h, seguido de reequilibrio con 2 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5 a 380 cm/h, lo que evita la pérdida de la proteína rIX-FP que puede provenir de la introducción de CaCl<sub>2</sub> mientras la alta conductividad del tampón de lavado estaba presente en la columna o algo a ese efecto y finalmente 5 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,5 a 380 cm/h. El rIX-FP purificado es eluido después de la columna mediante la aplicación de 5 volúmenes de columna de un fluido de elución que tiene Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 30 mM, pH 8,5 a 190 cm/h.

Después de la elución y recolección del rIX-FP purificado, la columna se regeneró mediante la aplicación de 3 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 2 M, pH 8,5 a 380 cm/hr.

#### **Ejemplo 1b: procedimiento con EDTA**

Al fluido de cultivo celular clarificado, es añadido EDTA al nivel bajo investigación (véase la Tabla 1) o a un valor en el intervalo de 5 a 150 mM. La conductividad es ajustada después a  $\leq 18$  mS/cm para dar equivalencia con respecto a la conductividad a la muestra de control con un tampón de dilución que consiste en Tris 20 mM, pH 7,0 más EDTA en la misma concentración que se añadió al fluido de cultivo celular.

Cuando son realizadas preparaciones a gran escala a EDTA 35 mM (véase el Ejemplo 1f), el fluido de cultivo celular clarificado es ajustado en primer lugar a una conductividad de  $\leq 13,5$  mS/cm mediante dilución con Tris - HCl 20 mM, pH 7,0. Después es añadido EDTA disódico a esta solución a un nivel de 35 mM, lo que lleva la conductividad nuevamente a un nivel comparable al de la materia prima de control no ajustada ( $\leq 18$  mS/cm).

De cualquier manera, la solución final (fluido de carga) es aplicada a una columna de intercambio aniónico empaquetada con POROS® HQ 50 (Applied Biosystems) a 380 cm/h. Esta columna había sido equilibrada previamente mediante la aplicación de tres volúmenes de columna de un fluido de equilibrio (MES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA disódico 50 mM, pH 5,0) a 380 cm/h. La conductividad de este tampón de equilibrio es similar a la del tampón correspondiente en el procedimiento de control mediante la disminución de la concentración de NaCl.

Después de aplicar el fluido de cultivo celular clarificado con EDTA ajustado (fluido de carga), cualquier material no unido es lavado de la columna mediante la aplicación de tres volúmenes de columna de un fluido de lavado (MES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA disódico 50 mM, pH 5,0) a 380 cm/h. Después son lavados contaminantes adicionales, menos fuertemente unidos que el rIX-FP, de la columna mediante la aplicación de cinco volúmenes de columna de un fluido de lavado (MES 50 mM, NaCl 195 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 5,0) a 380 cm/h, seguido de reequilibrio con 2 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM a 380 cm/h, pH 8,5 y finalmente 5 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,5 a 380 cm/h. El rIX-FP purificado se eluyó después de la columna mediante la aplicación de 5 volúmenes de columna de un fluido de elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 30 mM, pH 8,5) a 190 cm/h.

Después de la elución y la recolección del rIX-FP purificado, la columna es regenerada mediante la aplicación de 3 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 2 M, pH 8,5 a 380 cm/h.

#### **Ejemplo 1c: depuración de CHOP**

Los resultados de los experimentos de control repetidos y los experimentos con EDTA a diferentes niveles de EDTA en el fluido de carga son presentados en la Tabla 1. Esta depuración es presentada gráficamente en la Figura 1. La depuración de CHOP aumenta linealmente con la concentración de EDTA hasta un pico de aproximadamente 35 mM (con cierta tolerancia para la variación experimental), sin ser observadas otras ganancias más allá de este punto. Los niveles de CHOP se cuantificaron mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies catálogo #F015).

#### **Ejemplo 1d: eliminación de formas agregadas o degradadas de rIX-FP**

Las principales especies de proteínas observadas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica en cromatografía líquida de alto rendimiento son presentadas en la Tabla 2. El uso del procedimiento con EDTA reduce significativamente el nivel de agregados y fragmentos (productos de descomposición) en la elución. Esto también puede ser observado en la Figura 2, que presenta trazas SEC del producto eluido de los procedimientos de control y con EDTA.

**Ejemplo 1e: eliminación del Factor IXalfa**

5 El factor IXalfa es un producto de descomposición proteolítico específico proveniente de la escisión en solo el sitio de activación Arg145 - Ala146. Esta forma de proteína no es separable por SEC, ya que permanece unida mediante enlaces disulfuro y, por lo tanto, es un problema específico en la purificación de FIX. El uso del procedimiento con EDTA aumenta la depuración de esta especie como se muestra en la Figura 3, medida por electroforesis capilar analítica operada en condiciones reducidas y desnaturalizantes.

**Ejemplo 1f: purificación a gran escala de rIX-FP**

10 Son ajustados 500 L de fluido de cultivo celular clarificado a una conductividad a  $\leq 13,5$  mS/cm por dilución con Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Después es añadido EDTA disódico a esta solución a un nivel de 35 mM, lo que lleva la conductividad nuevamente hasta un nivel comparable al de la materia prima no ajustada ( $\leq 18$  mS/cm). Este material se aplicó después a un POROS® HQ 50 sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1b. La depuración de la célula huésped obtenida a esta escala es presentada en la Tabla 3 y la Figura 4, en comparación con la obtenida en aplicaciones a gran escala del procedimiento de control (Ejemplo 1a).

15

Tabla 1 - Datos experimentales del control (sin EDTA añadido) y experimentos con EDTA. Se añadió EDTA al líquido de cultivo celular clarificado a diversas concentraciones. En todos los experimentos con EDTA, los tampones de lavado de equilibrio y pos-carga fueron los mismos (MES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM, pH 5,0).

Experimento (Concentración de EDTA en el fluido de carga)	Etapa	Actividad		Total (ug)	CHOP/UI	Depuración en veces	Aumento en veces en la depuración sobre el promedio del procedimiento de control
		UI totales	Recuperación IU/OD				
Control 1	Fluido de carga	3075		28221	9,18		0 (Depuración promedio = 132 veces)
	Fluido de elución	1987	64,6	143	0,07	198	
Control 2	Fluido de carga	3191		13904	4,36		
	Fluido de elución	2406	93,8	130	0,054	107	
Control 3	Fluido de carga	38397		195779	5,10		
	Fluido de elución	25152	65,5	2142	0,09	91	
EDTA 10 mM	Fluido de carga	3212		13772	4,46		
	Fluido de elución	2486	77,4	34	0,014	406	3
EDTA 20 mM	Fluido de carga	3212		11554	3,75		
	Fluido de elución	2695	83,9	17,65	0,0065	655	5
EDTA 33 mM	Fluido de carga	3269		14556	4,45		
	Fluido de elución	3117	95,4	14	0,004	1048	7,9
EDTA 35 mM	Fluido de carga	3212		12545	3,75		
	Fluido de elución	2819	87,8	13,6	0,0048	922	7,0
EDTA 36 mM	Fluido de carga	2776		28221	10,17		
	Fluido de elución	2605	89,03	31	0,012	914	6,9

Experimento (Concentración de EDTA en el fluido de carga)	Etapa	Actividad			CHOP			
		UI totales	Recuperación	IU/OD	Total (ug)	CHOP/UI	Depuración en veces	Aumento en veces en la depuración sobre el promedio del procedimiento de control
EDTA 50 mM	Fluido de carga	3212			12697,4	3,046		
	Fluido de elucion	2561	79,7	84,5	13,94	0,005	911	6,9

Tabla 2 - % de abundancia de cada forma de rIX-FP en la elución determinada por SEC analítica

Experimento (Concentración de EDTA en el fluido de carga)	Agregado	Monómero	Fragmentos
Control 1	6,91	83,63	9,46
Control 2	6,23	87,47	6,3
Control 3	9,89	85,0	5,11
EDTA 10 mM	3,84	92,2	3,95
EDTA 20 mM	3,79	93,16	3,04
EDTA 33 mM	3,66	93,6	2,75
EDTA 35 mM	3,52	94,43	2,5
EDTA 36 mM	1,75	92,46	5,79
EDTA 50 mM	2,33	94,89	2,78

Tabla 3 – Depuración de CHOP a gran escala mediante el uso de EDTA

Tipo de procedimiento	Partida	Cantidad de CHOP (mg)		Veces de depuración de CHOP	X veces de aumento en la depuración de CHOP en comparación con el promedio del procedimiento de control
		Fluido de carga	Fluido de elución		
Control	1	11205	34,6	324	0 (Depuración promedio = 252 veces)
	2	10277	46,7	220	
	3	8896	37,8	235	
	4	12763	49,2	259	
	5	7748	34,7	223	
Con EDTA	6	6349	0,9	7054	24
	7	14628	1,4	10449	41
	8	7996	0,84	9519	38

5 **Ejemplo de referencia 2: procedimiento de purificación mejorada de rIX-FP en POROS® -HQ en presencia de compuestos químicos diferentes de EDTA en el tampón de carga**

Es investigado el efecto de diferentes compuestos químicos diferentes de EDTA usando un enfoque de detección por partidas de alto rendimiento con microplacas de filtro de 96 pocillos. Los compuestos investigados son ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiamina-N,N-disuccínico (EDDS), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminatetra (metilfosfónico) (EDTMP). El material de cosecha clarificado representativo es diluido 1: 1 con tampones de equilibrio 2 x y ajustado a una conductividad de 16,5 mS/cm con concentraciones finales de compuesto de 10, 20, 40 y 60 mM o sin compuesto añadido para las ejecuciones de control. Son analizados diferentes concentraciones de compuestos porque las concentraciones óptimas de compuestos pueden ser diferentes de EDTA y pH y las conductividades no son optimizadas para otros compuestos. En la tabla 4 son enumerados los tampones o soluciones para cada etapa.

10

15



**Tabla 4 – Tampones usados para el detección de alto rendimiento de diferentes compuestos de EDTA on POROS® 50 HQ**

<b>Etapa</b>	<b>Tampón</b>
Equilibrio	MES 50 mM, NaCl 85 mM (control) o combinaciones de NaCl y compuestos químicos (10, 20, 40 o 60 mM) para un total de 85 mM, pH 5,0, conductividad 17 mS/cm
Carga	Cosecha clarificada diluida 1:1 con tampones de equilibrio 2x (Mes 100 mM, NaCl 170 mM (control) o combinaciones de NaCl y compuestos químicos (20, 40, 80 o 120 mM) para un total de 170 mM) y ajustado a una conductividad de 16,5 mS/cm
Lavado de poscarga	MES 50 mM, NaCl 85 mM (control) o combinaciones de NaCl y compuestos químicos (10, 20, 40 o 60 mM) para un total de 85 mM, pH 5,0, conductividad 17 mS/cm
Lavado 1	MES 50 mM, NaCl 195 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH 5,0
Lavado 2	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5
Lavado 3	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 8,5
Elución	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 30 mM, pH 8,5

5 Para las etapas de incubación, las placas de filtro son agitadas en un agitador de microplacas a 1100 rpm durante el tiempo de incubación designado y el líquido es eliminado mediante el uso de un dispositivo de colector de vacío en una placa de almacenamiento de pocillos profundos. Cada conjunto de experimentos se realizó por cuadruplicado y se usaron los resultados promedio.

10 En detalle, las suspensiones espesas de resina POROS® 50 HQ son transferidas a placas de filtro de 96 pocillos (membrana de PVDF de 0,65 µm) y el tampón de almacenamiento es retirado de las resinas por vacío. Las resinas son incubadas con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos. El material de carga ajustado es incubado con las resinas durante un total de 40 minutos el flujo y es recogido. Las resinas son lavadas adicionalmente con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos y las fracciones de lavado son recogidas poscarga. Todas las resinas son incubadas con tampones de lavado 1, 2 y 3 durante 5 minutos cada uno. Las resinas son eluidas con 150 µL de tampón de elución durante 5 min. El material de carga, el flujo continuo, el lavado poscarga y las fracciones de elución son analizadas mediante el ensayo Albumin Blue 580 (Sigma Aldrich catálogo #05497) para determinar el contenido de albúmina humana. El contenido de CHOP es analizado mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies catálogo #F015). La Tabla 5 muestra los resultados para el Factor de reducción de CHOP y la Mejora del Factor de reducción de CHOP del procedimiento con EDTA y otros compuestos frente al procedimiento de control usando un enfoque de detección de alto rendimiento y en la Figura 5 se presentan los resultados como un gráfico.

**Tabla 5 – Aumento en el contenido de producto por CHOP y reducción de CHOP para la detección de alto rendimiento de diferentes compuestos de EDTA EN POROS® 50 HQ**

<b>Aditivo</b>	<b>Concentración [mM]</b>	<b>Producto por CHOP [mg/mg]</b>		<b>Factor de reducción CHO</b>	
		<b>Carga</b>	<b>Eluato</b>	<b>Factor</b>	<b>Comparación con el control [%]</b>
Control aditivo) (sin)	N/A	5,5 (promedio)	155 (promedio)	28,2 (promedio)	---
EDTA	40	4,8	359	74,8	165
NTA	40	9,4	367	39,0	38
EDDS	40	9,4	294	31,3	11
DTPA	40	10,2	438	43,0	52
EDTMP	5	9,2	490	53,3	89

**Ejemplo de referencia 3: procedimiento de purificación mejorada de rIX-FP en presencia de EDTA en el búfer de carga pero usando diferentes matrices de intercambio aniónico**

Es investigado el efecto de diferentes matrices de intercambio aniónico diferentes de POROS® 50 HQ usando un enfoque de detección por partidas de alto rendimiento con microplacas de filtro de 96 pocillos. Las matrices de intercambio aniónico investigadas fueron Macro-Prep® 25Q (Bio-Rad), Macro-Prep® DEAE (Bio-Rad) y Cellufine Q-500 (Chisso). El material de cosecha clarificado representativo es diluido 1:1 con tampones de equilibrio 2x y ajustado a una conductividad de 16,5 mS/cm con concentraciones finales de EDTA de 10, 20, 40 y 60 mM o sin compuesto añadido para las ejecuciones de control. Son analizadas diferentes concentraciones de EDTA porque la concentración óptima de EDTA puede ser diferente de POROS® 50 HQ y pH y las conductividades no son optimizadas para otras matrices de intercambio aniónico. En la Tabla 6 son enumerados los tampones o soluciones para cada etapa.

**Tabla 6 – Tampones usados para la detección de alto rendimiento de diferentes matrices de intercambio aniónico usando EDTA**

<b>Etapas</b>	<b>Tampón</b>
Equilibrio	MES 50 mM, NaCl 85 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA (10, 20, 40 o 60 mM) para un total de 85 mM, pH 5,0, conductividad 17 mS/cm
Carga	Cosecha clarificada diluida 1:1 con tampones de equilibrio 2x (Mes 100 mM, NaCl 170 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA (20, 40, 80 o 120 mM) para un total de 170 mM) y ajustada a una conductividad de 16,5 mS/cm
Lavado poscarga	MES 50 mM, NaCl 85 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA (10, 20, 40 o 60 mM) para un total de 85 mM, pH 5,0, conductividad 17 mS/cm
Lavado 1	MES 50 mM, NaCl 195 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH 5,0
Lavado 2	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5
Lavado 3	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 8,5
Elución	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 30 mM, pH 8,5

Para las etapas de incubación, las placas de filtro son agitadas en un agitador de microplacas a 1100 rpm durante el tiempo de incubación designado y el líquido es eliminado usando un dispositivo de colector de vacío en una placa de almacenamiento de pocillos profundos. Cada conjunto de experimentos es realizado por cuadruplicado y se utilizaron resultados promedio.

En detalle, las suspensiones espesas de resina de intercambio aniónico son transferidas a placas de filtro de 96 pocillos (membrana de PVDF de 0,65 µm) y el tampón de almacenamiento es retirado de las resinas por vacío. Las resinas son incubadas con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos. El material de carga ajustado es incubado con las resinas durante un total de 40 minutos y el flujo es recogido. Las resinas son lavadas adicionalmente con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos y las fracciones de lavado son recogidas poscarga. Todas las resinas son incubadas con tampones de lavado 1, 2 y 3 durante 5 minutos cada uno. Las resinas son eluidas con 150 µL de tampón de elución durante 5 min. El material de carga, el flujo continuo, el lavado poscarga y las fracciones de elución son analizados mediante el ensayo Albumin Blue 580 (Sigma Aldrich catálogo #05497) para determinar el contenido de albúmina humana. El contenido de CHOP se analizó mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies catálogo #F015). La Tabla 7 muestra los resultados para el Factor de reducción de CHOP y la mejora del factor de reducción de CHOP para el procedimiento POROS® y las otras matrices de intercambio aniónico frente al control usando un enfoque de detección de alto rendimiento y en la Figura 6 los resultados son presentados en forma de gráfico.

**Tabla 7 - Aumento en el contenido de producto por CHOP y reducción de CHOP para la detección de alto rendimiento de diferentes matrices de intercambio aniónico usando EDTA**

Resina	Concentración de EDTA [mM]	Producto por CHOP [mg/mg]		Factor de reducción CHO	
		Carga	Eluato	Factor	Comparación con el control [%]
Control (sin aditivo)	N/A	5,5 (promedio)	155 (promedio)	28,2 (promedio)	---
POROS® 50 HQ	40	4,8	359	74,8	165
Macro-Prep® 25Q	40	4,8	494	103,0	265
Macro-Prep® DEAE	40	6,3	283	45,0	60
Cellufine Q-500	40	6,3	573	91,0	223

**Ejemplo de referencia 4: procedimiento de purificación mejorada de rIX-FP en POROS®-HQ en presencia de EDTA en el tampón de lavado**

Se investigó el efecto de la presencia del EDTA únicamente en el tampón de lavado poscarga en POROS® 50 HQ usando un enfoque de detección por partidas de alto rendimiento con microplacas de filtro de 96 pocillos. El material de cosecha clarificado representativo se diluyó 1: 1 con tampones de equilibrio 2 x y se ajustó a una conductividad de 16,5 mS/cm sin EDTA añadido. Se usó una concentración de EDTA de 40 mM en el tampón de lavado pos- carga. En la tabla 8 se enumeran los tampones o soluciones para cada etapa.

**Tabla 8 – Tampones usados para la detección de alto rendimiento de diferentes matrices de intercambio aniónico usando EDTA**

Etapa	Tampón
Equilibrio	MES 50 mM, NaCl 85 mM
Carga	Cosecha clarificada diluida 1:1 con tampones de equilibrio 2x (Mes 100 mM, NaCl 170 mM y ajustado a una conductividad de 16,5 mS/cm)
Lavado por-carga	MES 50 mM, NaCl 85 mM (control) o 45 mM NaCl y 40 mM EDTA mM, pH 5,0, conductividad 17 mS/cm
Lavado 1	MES 50 mM, NaCl 195 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH 5,0
Lavado 2	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5
Lavado 3	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 8,5
Elución	TRIS-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl <sub>2</sub> 30 mM, pH 8,5

Para las etapas de incubación, las placas de filtro se agitaron en un agitador de microplacas a 1100 rpm durante el tiempo de incubación designado y el líquido se eliminó usando un dispositivo de colector de vacío en una placa de almacenamiento de pocillos profundos. Cada conjunto de experimentos se realizó por cuadruplicado y se utilizaron resultados promedio.

Las suspensiones espesas de resina POROS® 50 HQ se transfirieron a placas de filtro de 96 pocillos (membrana de PVDF de 0,65 µm y el tampón de almacenamiento se eliminó de las resinas por vacío. Las resinas se incubaron con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos. El material de carga ajustado se incubó con las resinas durante un total de 40 minutos y se recolectó el flujo. Las resinas se lavaron adicionalmente con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos y se recolectaron las fracciones de lavado poscarga. Todas las resinas se incubaron con tampones de lavado 1, 2 y 3 durante 5 minutos cada uno. Las resinas son eluidas con 150 µL de tampón de elución durante 5 min. El material de carga, el flujo continuo, lavado poscarga y fracciones de elución se analizaron mediante el ensayo Albumin Blue 580 (Sigma Aldrich catálogo #05497) para determinar el contenido de albúmina

humana. El contenido de CHOP se analizó mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies catálogo #F015). La Tabla 9 muestra los resultados para el Factor de reducción de CHOP y la mejora del factor de reducción de CHOP para EDTA que solo se hallan en el tampón de lavado pos- carga frente al control y en la Figura 7 los resultados se presentan en forma de gráfico.

5 **Tabla 9 – Mejora en el contenido del producto por CHOP y reducción de CHOP para la detección de alto rendimiento de EDTA solo en tampón de lavado poscarga usando POROS® 50 HQ**

Resina	Concentración de EDTA [mM]	Producto por CHOP [mg/mg]		Factor de reducción CHOP	
		Carga	Eluato	Factor	Comparación con el control [%]
Control (sin aditivo)	N/A	5,5 (promedio)	155 (promedio)	28,2 (promedio)	---
POROS® 50 HQ	40 (solo en tampón de lavado poscarga)	7,4	287	38,8	38

**Ejemplo de referencia 5: procedimiento de purificación mejorada de un anticuerpo monoclonal en la matriz AEX Fractogel® EMD TMAE en presencia de EDTA en el tampón de carga**

10 Se investigó el efecto del EDTA en la purificación de un anticuerpo monoclonal en una matriz de intercambio aniónico usando un enfoque de detección por partidas de alto rendimiento con microplacas de filtro de 96 pocillos. El material de cosecha clarificado representativo se diluyó 1: 1 con tampones de equilibrio 2x con concentraciones finales de EDTA de 5, 10 y 20 mM o ningún compuesto añadido para las ejecuciones de control. Se analizaron diferentes concentraciones de EDTA porque las condiciones de purificación no se optimizaron. La Tabla 10 enumera los  
15 tampones utilizados para cada etapa de la detección.

**Tabla 10 – Tampones usados para la detección de alto rendimiento de la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD TMAE usando EDTA**

Etapa	Tampón
Equilibrio	TRIS 10 mM, pH 9,0, NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA a una concentración final de 20 mM con Concentraciones de EDTA de 5, 10 o 20 mM
Carga	Cosecha clarificada ajustada a pH 9,0 y NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA a una concentración final de 20 mM con concentraciones de EDTA de 5, 10 o 20 mM
Lavado poscarga	TRIS 10 mM, pH 9,0, NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA a una concentración final de 20 mM con concentraciones de EDTA de 5, 10 o 20 mM
Lavado	TRIS 10 mM, pH 9,0, NaCl 20 mM
Elución	TRIS 10 mM, pH 9,0, NaCl 1 mM

20 Para las etapas de incubación, las placas de filtro se agitaron en un agitador de microplacas a 1100 rpm para el tiempo de incubación designado y el líquido se eliminó mediante el uso de un dispositivo colector de vacío en una placa de almacenamiento de pocillo profundo. Cada conjunto de experimentos se realizó por cuadruplicado y se usaron los resultados promedio.

25 Las suspensiones espesas de resina Fractogel® EMD TMAE se transfirieron a placas de filtro de 96 pocillos (membrana de PVDF de 0,65 µm) y el tampón de almacenamiento se eliminó de las resinas por vacío. Las resinas se incubaron con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos. El material de carga ajustado se incubó con las resinas durante un total de 40 minutos y se recolectó el flujo. Las resinas se lavaron adicionalmente con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos y se recolectaron las fracciones de lavado poscarga. Todas las resinas se lavaron con tampón de equilibrio sin compuestos añadidos durante 5 minutos cada una. Las resinas son eluidas con 150 µL de tampón de elución durante 5 min. El material de carga, el flujo continuo, el lavado poscarga y  
30 las fracciones de elución son analizados mediante HPLC de proteína A para determinar el contenido de IgG. El contenido de CHOP se analizó mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus

Technologies catálogo #F015). La tabla 11 muestra los resultados para el factor de reducción de CHOP y la mejora del factor de reducción de CHOP para aumentar las concentraciones de EDTA frente al control para la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD TMAE usando un enfoque de detección de alto rendimiento y en la Figura 8 los resultados se presentan como un gráfico.

5 **Tabla 11 – Mejora en el contenido del producto por CHOP y reducción de CHOP para la detección de alto rendimiento de la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD TMAE usando EDTA**

Resina	Concentración de EDTA [mM]	Producto por CHOP [mg/mg]		Factor de reducción CHOP	
		Carga	Eluato	Factor	Comparación con el control [%]
Control (sin aditivo)	N/A	14,8	31,5	2,1	---
Fractogel® EMD TMAE (M)	10	14,7	46,4	3,2	52

**Ejemplo de referencia 6: procedimiento de purificación mejorada de un anticuerpo monoclonal en la matriz CEX Fractogel® EMD SO3 en presencia de DPA en el tampón de carga**

10 Se investigó el efecto de la 2,2'-dipicolilamina (DPA) en la purificación de un anticuerpo monoclonal en una matriz de intercambio catiónico usando un enfoque de detección por partidas de alto rendimiento con microplacas de filtro de 96 pocillos. El material de cosecha clarificado representativo es diluido 1:1 con tampones de equilibrio 2 x con concentraciones finales de DPA de 5, 10 y 20 mM o ningún compuesto añadido para las ejecuciones de control. Son analizados diferentes concentraciones de DPA porque las condiciones de purificación no se optimizaron. La Tabla 12  
 15 enumera los tampones usados para cada etapa de la detección.

**Tabla 12 – Tampones usados para la detección de alto rendimiento de la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD SO3 usando DPA**

Etapa	Tampón
Equilibrio	10 mM MES, pH 6,0, NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA a una concentración final de 20 mM con concentraciones de DPA de 5, 10 o 20 mM
Load	Cosecha clarificada ajustada a pH 6,0 y NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y DPA a una concentración final de 20 mM con concentraciones de DPA de 5, 10 o 20 mM
Lavado poscarga	10 mM MES, pH 6,0, NaCl 20 mM (control) o combinaciones de NaCl y EDTA a una concentración final de 20 mM con concentraciones de DPA de 5, 10 o 20 mM
Lavado	10 mM MES, pH 6,0, NaCl 20 mM
Elución	10 mM MES, pH 6,0, NaCl 300 mM

20 Para las etapas de incubación, las placas de filtro se agitaron en un agitador de microplacas a 1100 rpm para el tiempo de incubación designado y el líquido se eliminó mediante el uso de un dispositivo colector de vacío en una placa de almacenamiento de pocillo profundo. Cada conjunto de experimentos se realizó por cuadruplicado y se usaron los resultados promedio.

25 Las suspensiones espesas de resina Fractogel® EMD TMAE son transferidas a placas de filtro de 96 pocillos (membrana de PVDF de 0,65 µm) y el tampón de almacenamiento se eliminó de las resinas por vacío. Las resinas se incubaron con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos. El material de carga ajustado se incubó con las resinas durante un total de 40 minutos y se recolectó el flujo. Las resinas se lavaron adicionalmente con los tampones de equilibrio respectivos durante 5 minutos y se recolectaron las fracciones de lavado poscarga. Todas las resinas se lavaron con tampón de equilibrio sin compuestos añadidos durante 5 minutos cada una. Las resinas son eluidas con 150 µL de tampón de elución durante 5 min. El material de carga, el flujo continuo, el lavado poscarga y  
 30 las fracciones de elución son analizados mediante HPLC de proteína A para determinar el contenido de IgG. El contenido de CHOP es analizado mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Cygnus

Technologies catálogo #F015). La tabla 13 muestra los resultados para el factor de reducción de CHOP y la mejora del factor de reducción de CHOP para aumentar las concentraciones de DPA frente al control para la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD TMAE usando un enfoque de detección de alto rendimiento y en la Figura 9 los resultados se presentan como un gráfico.

5 **Tabla 13 - Mejora en el contenido del producto por CHOP y reducción de CHOP para la detección de alto rendimiento de la purificación de un anticuerpo monoclonal en Fractogel® EMD TMAE usando DPA**

Resina	Concentración de EDTA [mM]	Producto por CHOP [mg/mg]		Factor de reducción CHOP	
		Carga	Eluato	Factor	Comparación con el control [%]
Control (sin aditivo)	N/A	14,9	255	17,1	---
Fractogel® EMD SO3 (M)	20	14,8	293	19,8	16

**Ejemplo de referencia 7: procedimiento de purificación mejorada de rVIIa-FP en la matriz AEX POROS® 50 HQ usando EDTA como aditivo**

- 10 El FVIIa fusionado con albúmina recombinante es expresado en células CHO-S según lo descrito por Weimer *et al.* (Thromb. Hemost. (2008) Vol 99 (4) pp. 659-67. El fluido de cultivo celular clarificado es ajustado a diferentes niveles de EDTA, pH y conductividad y es aplicado a una columna de intercambio aniónico empaquetada con POROS® HQ 50 (Applied Biosystems) Esta columna había sido equilibrada previamente con HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,2, ajustada a las mismas condiciones que el fluido de cultivo celular clarificado, por ejemplo, enriquecimiento con EDTA.
- 15 La carga fue seguida por un lavado poscarga con el tampón de equilibrio respectivo. Cualquier material no unido se lavó de la columna con HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,2. El rVIIa-FP purificado después se eluyó de la columna con HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 6,2. Se midió la actividad de rVIIa-FP con un ensayo de actividad cromogénica y el contenido de CHOP se analizó mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies Catálogo #F015). La Tabla 14 muestra los resultados para el Factor de reducción de CHOP y la mejora del factor de reducción de CHOP para el procedimiento con POROS® y frente al control para las diferentes
- 20 concentraciones de EDTA y en la Figura 10 los resultados son presentados en forma de gráfico.

**Tabla 14 – Mejora en el contenido de FVIIa por CHOP y reducción de CHOP para EDTA en POROS® 50 HQ**

Concentración de EDTA (mM)	Producto por CHOP (mg/mg)		Factor de reducción CHO	
	Carga	Eluato	Factor	Comparación con el control [%]
0	55	43	0,8	---
5	299	586	2,0	150
10	216	3042	14,1	1663
15	452	5159	11,4	1325
20	361	3769	10,4	1200
40	487	2564	5,3	563

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de purificación de un polipéptido de interés por cromatografía de intercambio catiónico en el que un compuesto químico se añade en una concentración de al menos 7 mM
- 5 a) a un fluido de equilibrio de la matriz de intercambio catiónico en el que el fluido de equilibrio se ajusta para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de equilibrio se una a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico
- y/o
- 10 b) a un fluido de carga que se aplica a la matriz de intercambio catiónico y que comprende el polipéptido de interés en el que el fluido de carga se ajusta para que al menos parte del compuesto químico y al menos parte del polipéptido de interés en el fluido de carga se unan a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico
- y/o
- 15 c) a un fluido de lavado que se usa para lavar la matriz de intercambio catiónico una vez que el polipéptido de interés se haya unido a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico en el que el fluido de lavado se ajusta para que al menos parte del compuesto químico en el fluido de lavado se una a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de intercambio catiónico y que al menos parte del polipéptido de interés y al menos parte del compuesto químico ya unidos si son añadidos en la etapa a) o b) continúen unidos a la matriz de intercambio catiónico debido a una carga que es opuesta a la carga de la matriz de
- 20 intercambio catiónico
- de este modo aumentando la cantidad del polipéptido de interés unido a la matriz de intercambio catiónico con relación a la cantidad de una o más impurezas unidas a la matriz de intercambio catiónico antes de que la matriz de intercambio catiónico se eluya y de este modo conduciendo a una relación aumentada del polipéptido de interés a una o más impurezas en el eluato en comparación con el mismo procedimiento en el que el
- 25 compuesto químico se añade a una concentración menor que 7 mM,
- en el que el compuesto químico se selecciona de una lista que consiste en estructuras químicas con grupos amino y/o polímeros de aminoácidos catiónicos, tal como tetraetilenpentamina (TEPA), dipicolilamina (DPA), polilisina, poliarginina y polihistidina.
- 30 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las impurezas comprenden proteínas de la célula huésped y/o ácidos nucleicos de la célula huésped y/o contaminantes relacionados con el producto y/o virus y/o priones y/o endotoxinas y/o contaminantes relacionados con el procedimiento.

Figura 1

Depuración de CHOP a varias concentraciones de EDTA

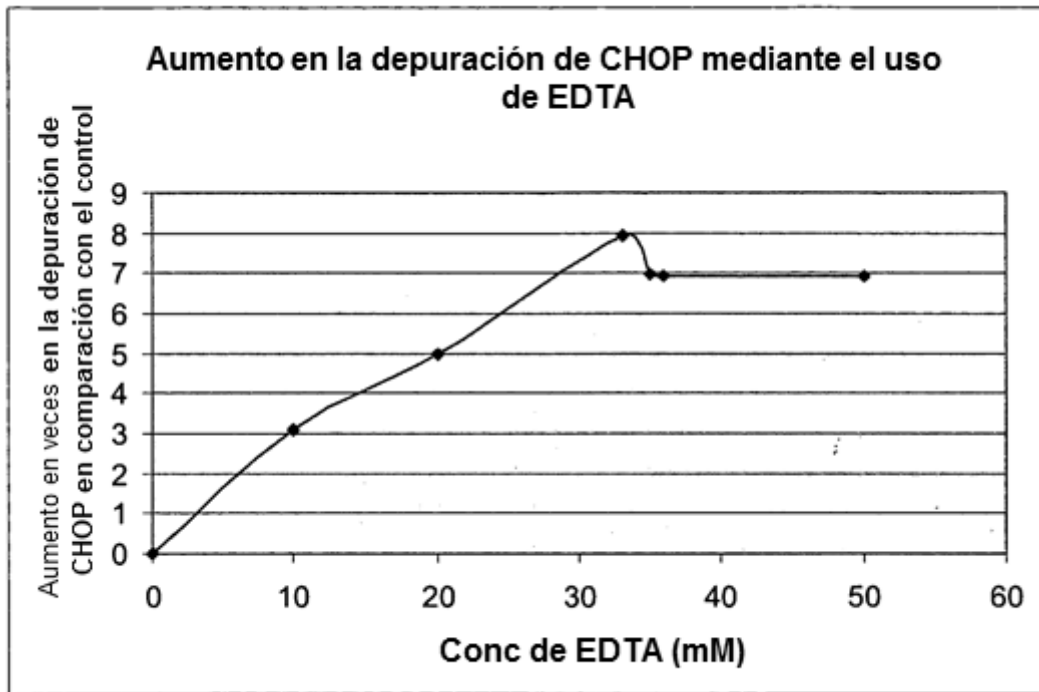




Figura 2

SEC analítica del eluato de los procedimientos de control y con EDTA

12,849: Agregados, 15,171: rIX-FP monomérico, 17,270: Formas degradadas de rIX-FP, 19,625: Formas degradadas de rIX-FP

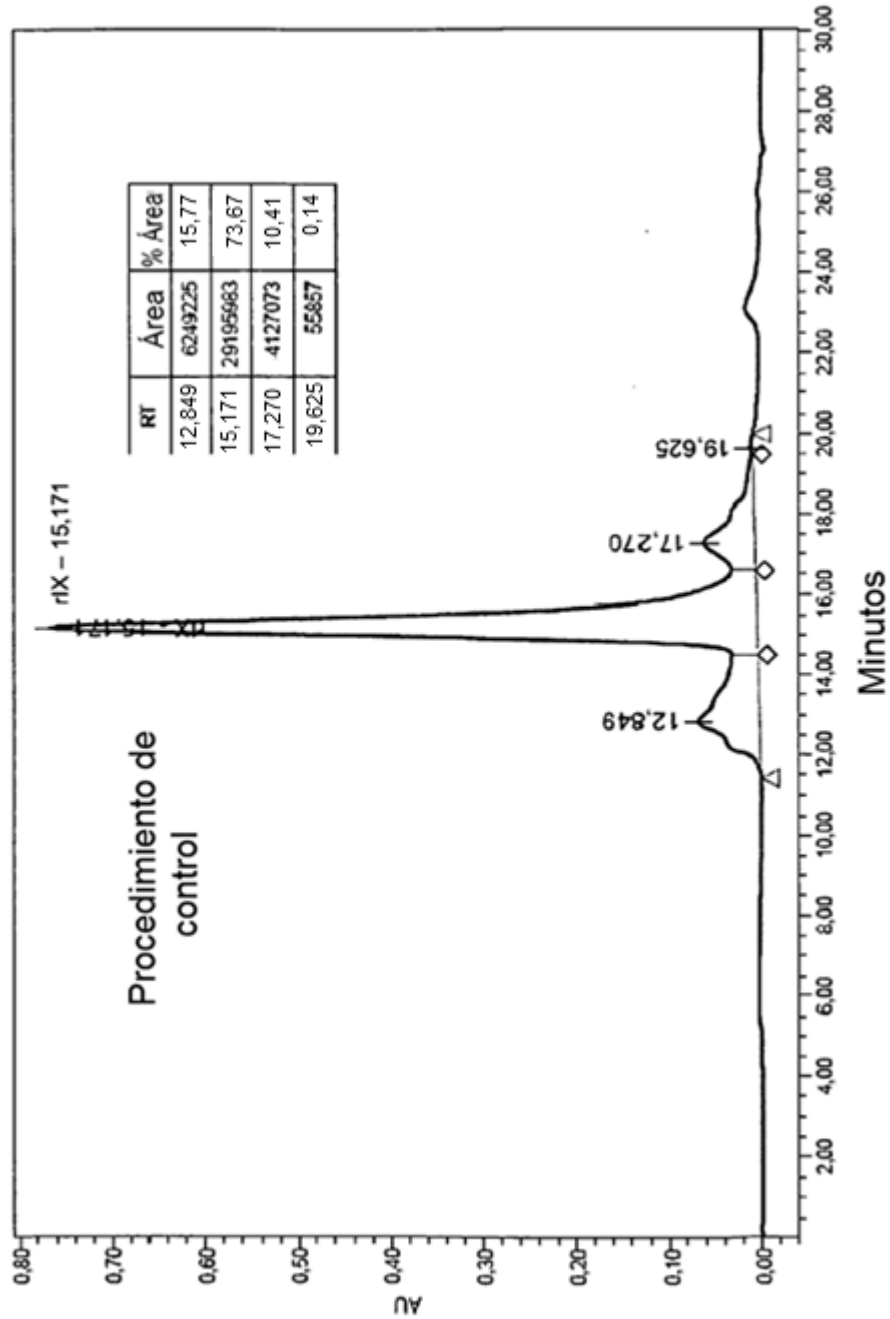


Figura 2 continuación

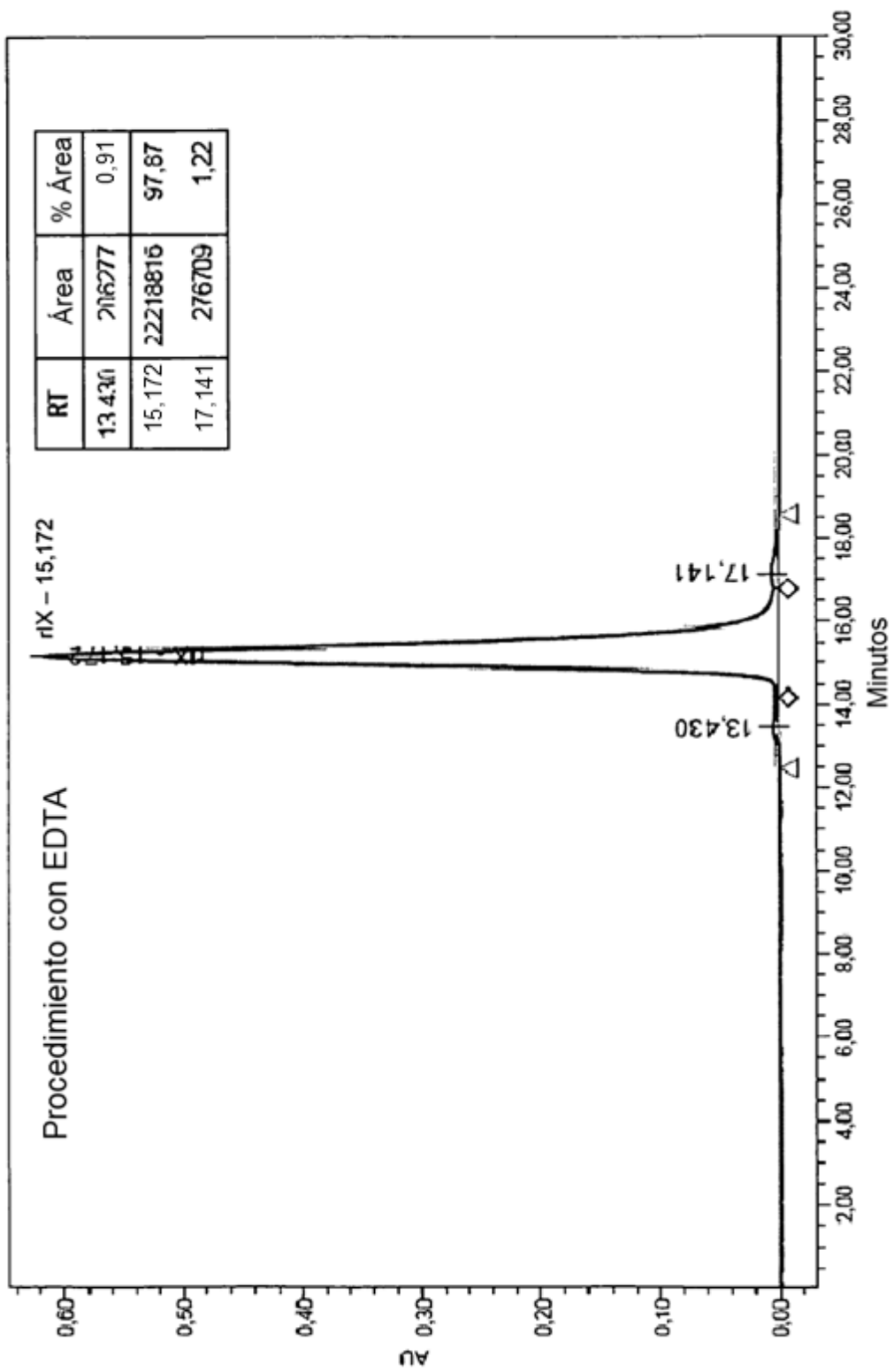


Figura 3 – Nivel del Factor IX alfa en el eluato de los procedimientos de control y con EDTA

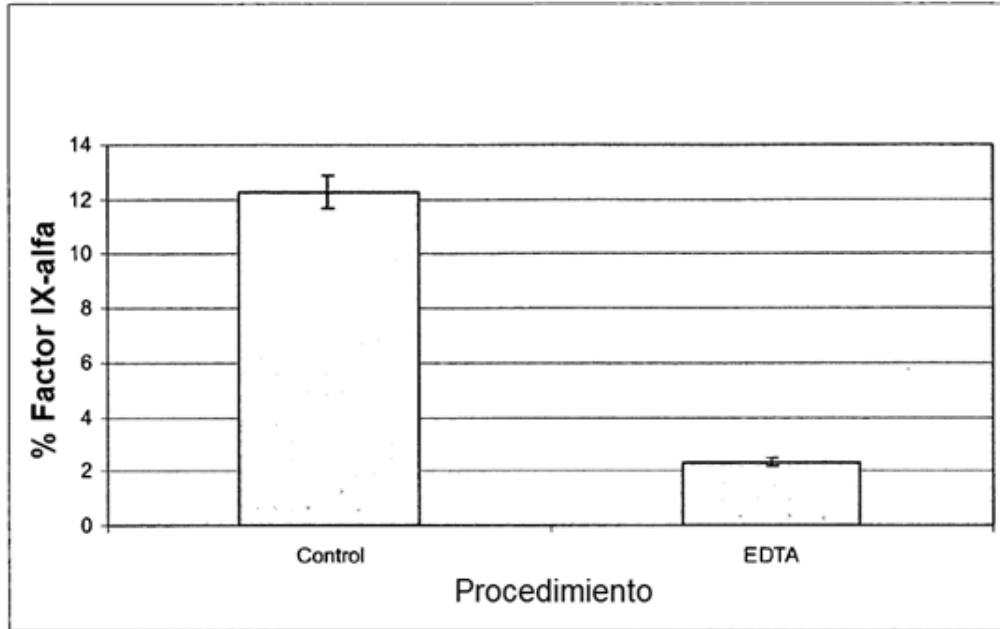


Figura 4- Depuración de CHOP en fabricación a gran escala

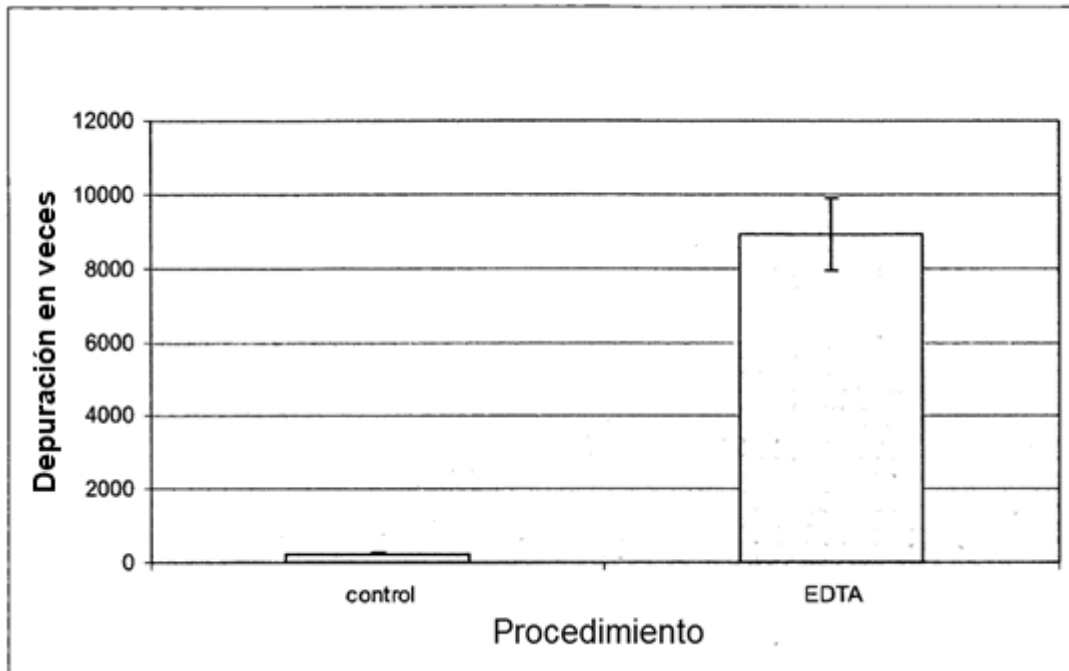


Figura 5- Factor de reducción de CHOP para diferentes compuestos en POROS® 50 HQ

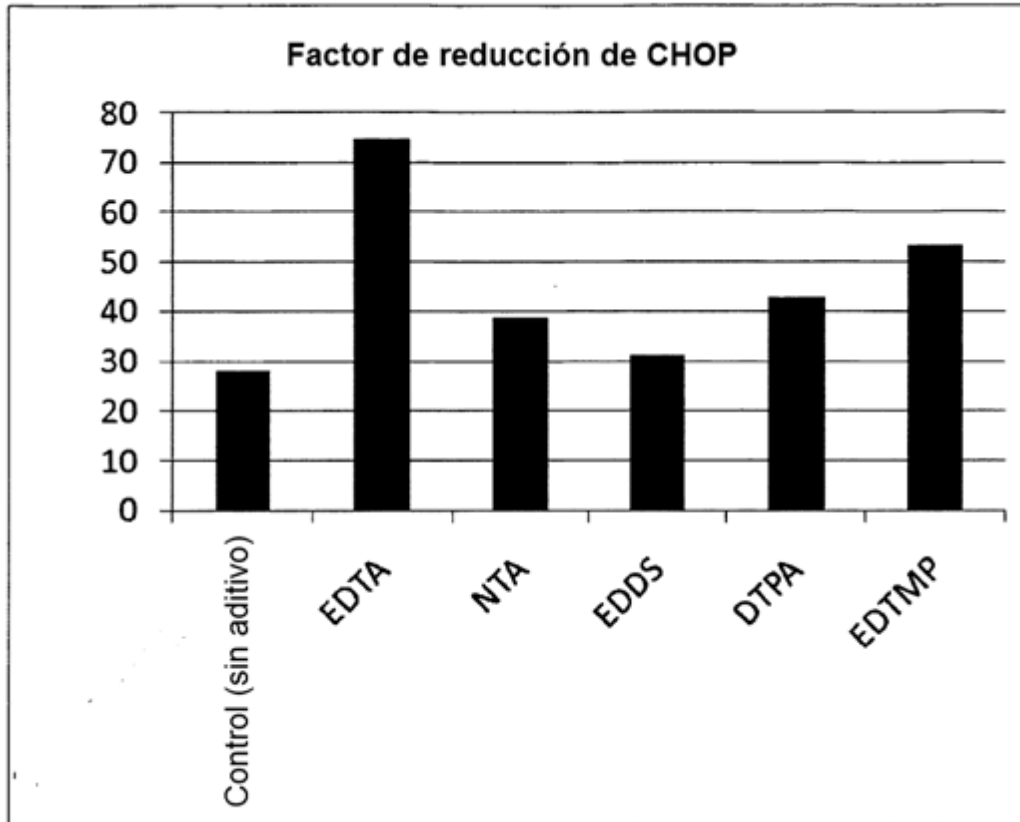


Figura 6- Factor de reducción de CHOP para diferentes matrices de intercambio aniónico usando EDTA

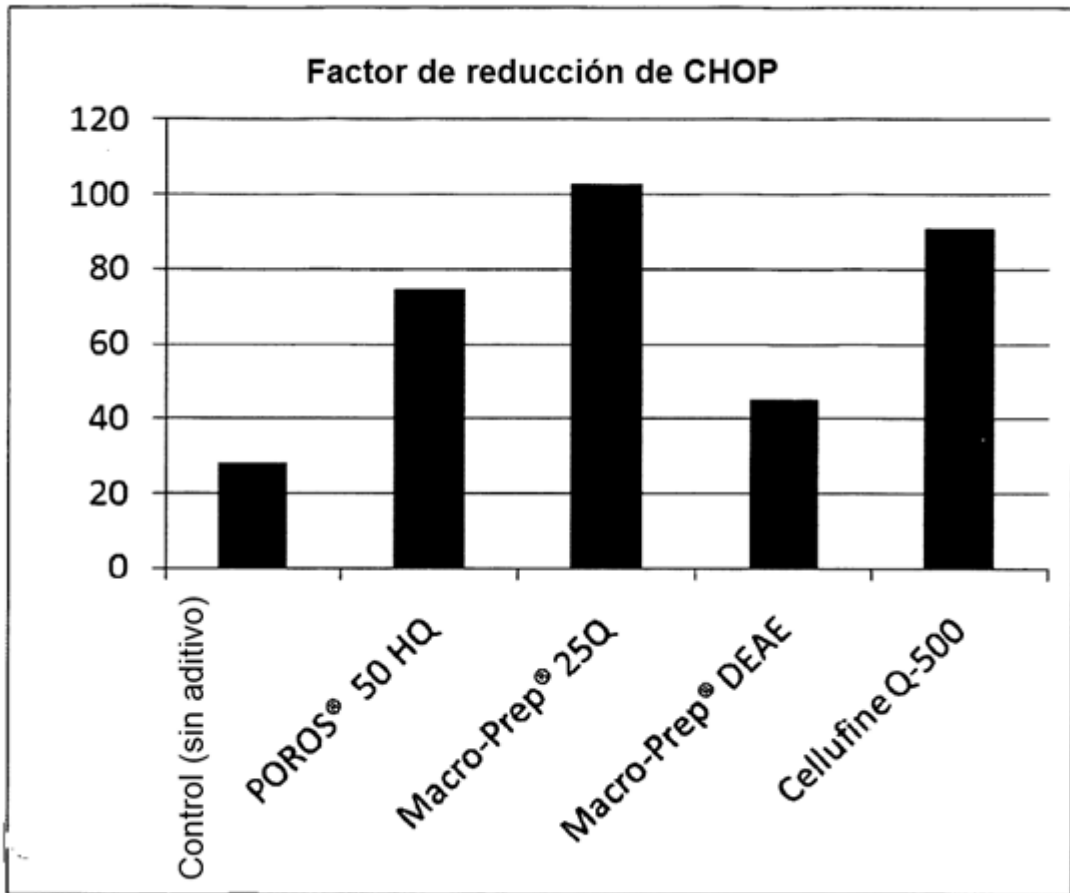


Figura 7- Factor de reducción de CHOP para POROS® 50 HQ y EDTA solo en tampón de lavado poscarga

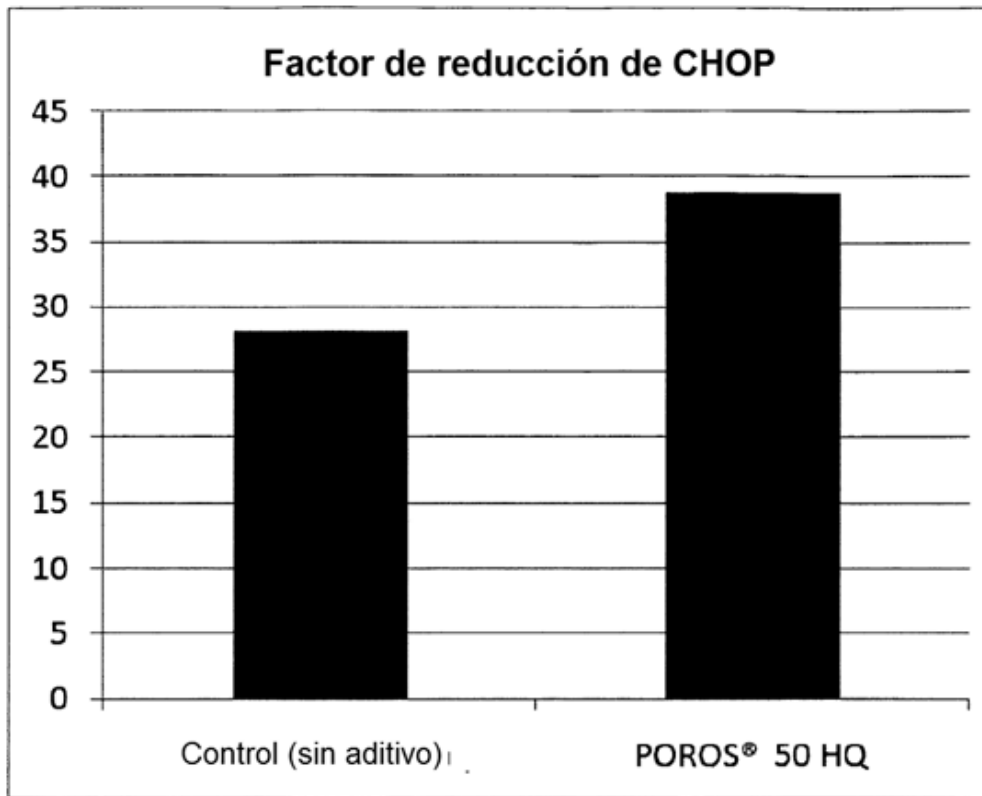


Figura 8- Factor de reducción de CHOP para el anticuerpo monoclonal en la matriz de intercambio aniónico FRACTOGEL® EMD TMAE (M) usando EDTA

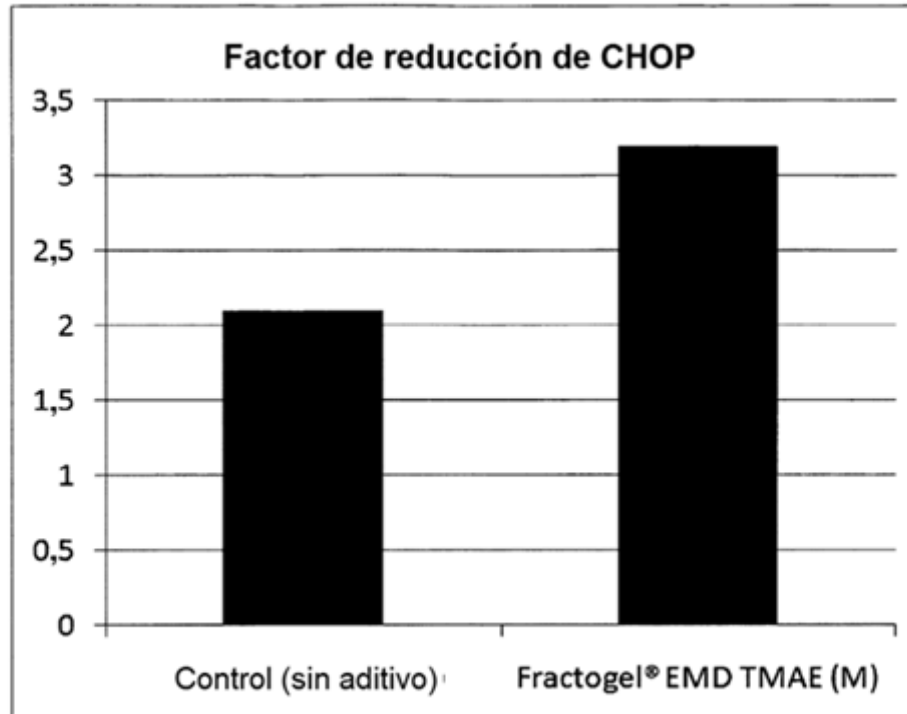




Figura 9- Factor de reducción de CHOP para el anticuerpo monoclonal en la matriz de intercambio catiónico FRACTOGEL® EMD SO3 (M) usando DPA

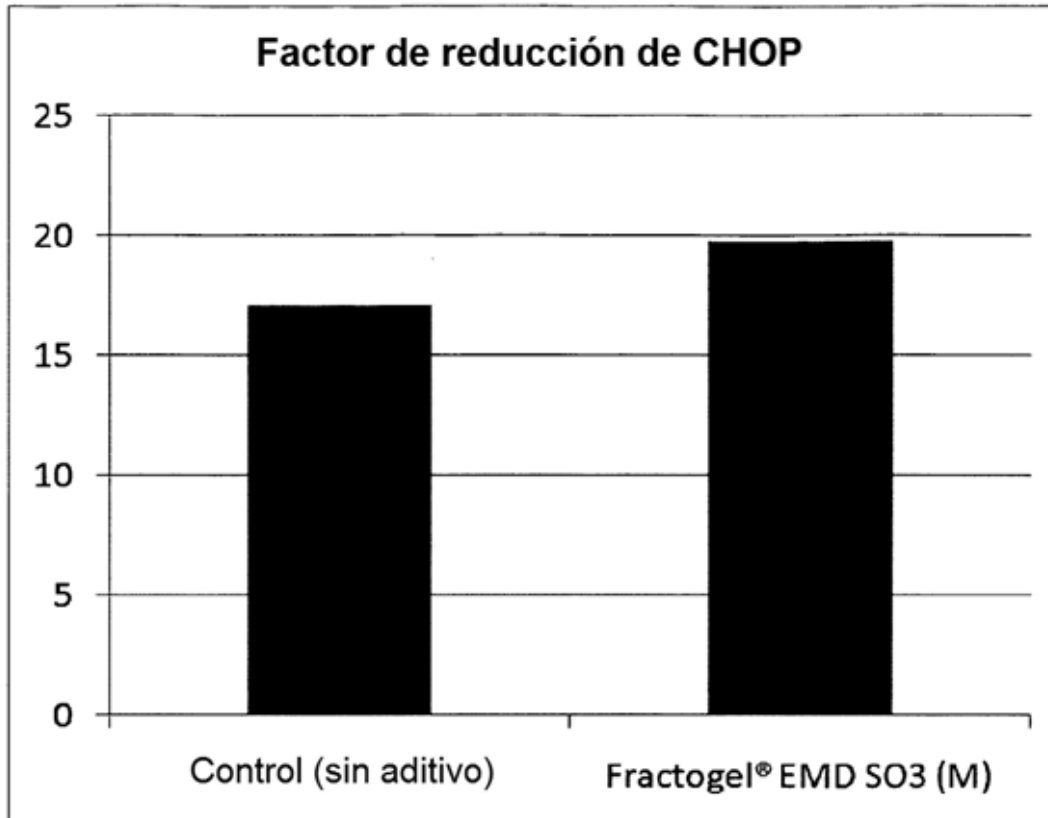


Figura 10- Factores de reducción de CHOP para rVIIa-FP en POROS® 50 HQ usando diferentes concentraciones de EDTA versus control sin adición de EDTA

