

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 480**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 1/18</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/30</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/32</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/36</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/38</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/16</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/20</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/22</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2006 PCT/US2006/008919**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2006 WO06099308**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2006 E 06738028 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 1869065**

54 Título: **Un procedimiento de cromatografía de reparto débil**

30 Prioridad:

**11.03.2005 US 660437 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.12.2020**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, PAUL;  
COFFMAN, JON;  
GODAVARTI, RANGANATHAN;  
ISKRA, TIM;  
KELLEY, BRIAN D.;  
VUNNUM, SURESH;  
SUN, SHUJUN;  
YU, TIANNING;  
BOOTH, JAMES, EDWARD y  
SWITZER, MARY BETH**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 797 480 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

Un procedimiento de cromatografía de reparto débil

### Campo de la invención

5 La invención se refiere a procedimientos de recuperación de un producto purificado a partir de un fluido de carga que incluye una o más impurezas. En determinadas realizaciones de la invención, los procedimientos comprenden hacer pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio y recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático. En otras realizaciones de la invención, los procedimientos comprenden hacer pasar la carga a través de un medio en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1.

### Antecedentes de la invención

15 Dentro de la industria de la biotecnología, la purificación de proteínas a escala comercial es una prueba importante para el desarrollo de proteínas recombinantes con fines terapéuticos y de diagnóstico. Los problemas relacionados con el rendimiento, la pureza y la productividad afectan al sector de la fabricación. Con la llegada de la tecnología de las proteínas recombinantes, se puede producir una proteína de interés usando líneas de células hospedadoras eucariotas o procariontes cultivadas diseñadas para expresar un gen que codifica la proteína. Sin embargo, lo que resulta del procedimiento de cultivo de células hospedadoras es una mezcla de la proteína deseada junto con las impurezas que se derivan de la propia proteína, tales como las variantes de proteína, o de la célula hospedadora, tales como las proteínas de células hospedadoras. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas depende de que se puedan recuperar fiablemente niveles adecuados de la proteína a partir de estas impurezas.

25 Los procedimientos de purificación de proteínas convencionales están diseñados para separar la proteína de interés de las impurezas basándose en las diferencias en cuanto al tamaño, la carga, la solubilidad y el grado de hidrofobicidad. Tales procedimientos incluyen procedimientos cromatográficos, tales como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado y la cromatografía de hidroxapatita. Estos procedimientos, a menudo, emplean un medio de separación que se puede diseñar para adherirse selectivamente a la proteína de interés o las impurezas. En el modo de unión-elución, la proteína deseada se une selectivamente al medio de separación y se eluye diferencialmente del medio mediante diferentes disolventes. En el modo de flujo continuo, las impurezas se unen específicamente al medio de separación, mientras que la proteína de interés no lo hace, permitiendo así la recuperación de la proteína deseada en el "flujo continuo".

35 Los procedimientos actuales para la purificación de proteínas, tales como los anticuerpos, incluyen dos o más etapas cromatográficas. Por ejemplo, la primera etapa en el protocolo de purificación de proteínas, a menudo, implica una etapa de cromatografía de afinidad que utiliza una interacción específica entre la proteína de interés y un reactivo de captura inmovilizado. Los adsorbentes de proteína A son particularmente útiles para la captura por afinidad de proteínas, tales como los anticuerpos, que contienen una región Fc. Sin embargo, los inconvenientes del uso de la cromatografía de proteína A para la purificación de proteínas incluyen la filtración del agente de captura de proteína A, que conduce a la contaminación del producto de proteína eluido. Adicionalmente, la captura por afinidad no separa las variantes de proteína, tales como las formas agregadas de la proteína, de la proteína de interés.

40 Los investigadores han usado procedimientos de unión-elución, procedimientos de flujo continuo y procedimientos de desplazamiento en sus esfuerzos por recuperar las proteínas libres de impurezas que resultan tanto del procedimiento de cultivo como de posibles etapas anteriores en el procedimiento de purificación propiamente dicho. Los ejemplos de grupos que usan una etapa de unión-elución como segunda etapa típica para purificar proteínas después de una etapa de captura por afinidad incluyen: la patente estadounidense 4.983.722, que describe un procedimiento de intercambio de iones de unión-elución de reducción de la proteína A de una mezcla; la patente estadounidense 5.429.746, que describe un procedimiento de cromatografía de interacción hidrófoba de unión-elución para la purificación del anticuerpo IgG de una mezcla que incluye impurezas de proteína A; y la patente estadounidense 5.644.036, que describe un procedimiento de tres etapas para la obtención de una preparación de anticuerpos IgG purificados que comprende una etapa de proteína A, una etapa de intercambio de iones de unión-elución y una etapa de exclusión por tamaños. Otros grupos han usado una etapa de flujo continuo después de la etapa de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, la publicación de PCT WO 04/076485 describe un procedimiento para la retirada de la proteína A filtrada de un anticuerpo purificado mediante una etapa de cromatografía de proteína A, seguida de una etapa de intercambio de iones de flujo continuo. La publicación de PCT WO 03/059935 describe un procedimiento para la purificación de una proteína en una muestra que comprende someter la muestra a una etapa de cromatografía de hidroxapatita de flujo continuo después de una etapa de cromatografía de afinidad.

55 Otros grupos han usado un esquema de purificación de una etapa de pulido individual para evitar los problemas asociados a las etapas de purificación anteriores. Por ejemplo, la patente estadounidense 6.177.548 describe un procedimiento de intercambio de iones de flujo continuo de una etapa individual para la retirada de agregados de una

muestra biológica, en el que el pH de la muestra se ajusta hasta 0,2 log por debajo del punto isoeléctrico de la muestra biológica. La patente estadounidense 5.451.662 describe un procedimiento de intercambio de iones de unión-elución de una etapa individual, en el que el pH de la mezcla de proteína en bruto se ajusta hasta un punto entre los intervalos de puntos isoeléctricos de las fracciones de proteína a separar. La publicación de PCT WO 05/044856 describe un procedimiento de desplazamiento de una etapa individual para la retirada de agregados de peso molecular alto de preparaciones de anticuerpos usando la cromatografía de hidroxapatita.

Sin embargo, ninguno de los procedimientos convencionales de unión-elución o flujo continuo en la técnica anterior puede satisfacer las necesidades de la industria de la biotecnología en términos de la totalidad de los requisitos de productividad, rendimiento y pureza del producto. Los procedimientos de unión-elución y los procedimientos de desplazamiento están limitados por, entre otros factores, el límite de capacidad del medio de separación para la proteína deseada. Los procedimientos de flujo continuo, por otro lado, sí permiten mayores pruebas de carga que los procedimientos de unión-elución, pero están limitados por la capacidad del medio de separación para las impurezas. Con los procedimientos de flujo continuo, no se produce ninguna unión sustancial del producto a la columna; se considera que cualquier unión de producto sustancial afecta negativamente a la recuperación de producto. Sigue existiendo la necesidad de procedimientos de recuperación de proteínas purificadas a alta productividad que cumplan los requisitos de pureza y rendimiento necesarios para las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Además, los procedimientos de fabricación comercial añaden las necesidades de esquemas de purificación que sean fiables, sólidos y rentables.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

La presente invención se refiere a procedimientos de recuperación de un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio y la recuperación del producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático. En otras realizaciones, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 5 mg de producto por ml de medio. En otra realización, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 10 mg de producto por ml de medio. En otras realizaciones, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 20, 30, 40, 50 o 60 mg de producto por ml de medio.

La presente invención también se refiere a procedimientos de recuperación de un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1 y la recuperación del producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático. En una realización, el coeficiente de reparto está en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 20,0. En otra realización, el coeficiente de reparto está en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10,0. En otra realización, el coeficiente de reparto está en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0. En otra realización, el coeficiente de reparto está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0. En una realización adicional, el coeficiente de reparto está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

La presente invención también se refiere a procedimientos de recuperación de un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a entre 1 y aproximadamente 70 mg de producto por ml de medio y definidas mediante un coeficiente de reparto de 0,3 a 20 y la recuperación del producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

La invención también contempla la identificación, en una etapa de cribado, de las condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, se definen mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1. La etapa de cribado puede emplear estudios de unión de lotes o estudios de unión de columnas, tales como los estudios de elución de gradiente o estudios de elución isocrática.

Las condiciones de operación incluyen niveles de pH, resistencias iónicas, concentraciones de sal, concentraciones de excipientes (tales como concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina y concentraciones de HEPES) y niveles de contraligando (tales como concentraciones de imidazol), dependiendo de la selección del medio.

El medio puede ser cualquier tipo de resina cromatográfica o medio de separación, incluyendo un medio de intercambio de iones cargado, tal como un medio de intercambio de aniones o un medio de intercambio de cationes, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, una resina de hidroxapatita o una resina de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.

Los productos purificados que se pueden recuperar usando la invención incluyen proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunocóncjugados, citocinas, interleucinas, hormonas y enzimas terapéuticas.

Las impurezas que se pueden retirar usando la invención incluyen proteínas de células hospedadoras, ácidos nucleicos, variantes de producto, endotoxinas, proteína A y virus.

En una realización, el medio retira al menos el 99,9 % de las impurezas en el fluido de carga, incluyendo las proteínas de células hospedadoras, los ácidos nucleicos, las variantes de producto, las endotoxinas y la proteína A.

- 5 En otra realización, la concentración de las variantes de producto en el producto purificado es de no más de aproximadamente el 2 %.

En realizaciones adicionales, la carga en el medio puede ser en una prueba de carga de al menos 500 mg o al menos 1.000 mg de producto por ml de medio.

- 10 En un aspecto de la invención, se recupera un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de un medio de intercambio de iones cargado en condiciones de operación que comprenden niveles de pH y resistencias iónicas que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1.

- 15 En otro aspecto de la invención, se recupera un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de operación que comprenden niveles de pH, resistencias iónicas y concentraciones de sal que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1.

- 20 En otro aspecto de la invención, se recupera un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de una resina de cromatografía de hidroxapatita en condiciones de operación que comprenden niveles de pH, resistencias iónicas, concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina, concentraciones de HEPES y concentraciones de imidazol que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1.

- 25 En otro aspecto más de la invención, se recupera un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas mediante el paso del fluido de carga a través de una resina de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado en condiciones de operación que comprenden niveles de contraligando y niveles de pH que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, en condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1.

- 30 Los procedimientos de la invención se pueden combinar, opcionalmente, con una o más etapas de purificación. La/s etapa/s opcional/es se puede/pueden realizar antes o después de la práctica del procedimiento de la invención. Por ejemplo, los procedimientos de la invención se pueden combinar, opcionalmente, con una etapa de cromatografía de proteína A como etapa inicial.

- 35 En una realización de la invención, un fluido que contiene producto se eluye de una columna de proteína A usando un tampón de elución de resistencia iónica baja; el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan usando un tampón de neutralización que da como resultado no más de 20 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto, lo que da como resultado el fluido de carga; y el fluido de carga se hace pasar a través de un medio de intercambio de aniones en las condiciones de operación de la invención.

- 40 En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende moléculas con un grupo catiónico cargado con un pKa de 6,5-10. En otras realizaciones, el tampón de elución comprende, además, moléculas con un grupo aniónico cargado con un pKa de 2-5. En determinadas realizaciones, el tampón de elución comprende moléculas que son iones híbridos a pH entre 7 y 9.

La invención también contempla productos purificados, incluyendo proteínas y anticuerpos purificados, preparados mediante los procedimientos de la invención.

- 45 Los objetos y las ventajas adicionales de la invención, en parte, se expondrán en la descripción que sigue y, en parte, resultarán evidentes a partir de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los objetos y las ventajas de la invención se realizarán y conseguirán por medio de los elementos y las combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas.

- 50 Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, tal como se reivindica.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y forman parte de la presente memoria descriptiva, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra (A) la relación entre un coeficiente de reparto y una isoterma de adsorción de producto; y (B) las isotermas de adsorción para la unión del producto a la resina, en tres modos de operación: modo de unión-elución, modo de reparto débil y modo de flujo continuo.

La Figura 2 muestra (A) las regiones de reparto de tres modos de operación en la cromatografía de intercambio de iones: modo de unión-elución, modo de reparto débil y modo de flujo continuo; y (B) las regiones de reparto de tres modos de operación en la hidroxapatita.

La Figura 3 muestra los cromatogramas esquemáticos de tres modos de operación: modo de unión-elución, modo de reparto débil y modo de flujo continuo.

La Figura 4 muestra una comparación entre los cromatogramas de reparto débil y de flujo continuo.

La Figura 5 muestra (A) los perfiles de retirada de contaminantes típicos en función del  $K_p$ ; y (B) la recuperación en función de la prueba de carga y el  $K_p$ .

La Figura 6 muestra la evolución típica del desarrollo de las etapas de la cromatografía de reparto débil, incluyendo 1) el cribado de alta productividad para determinar el  $K_p$ , 2) las pasadas de prueba de carga baja, 3) las pasadas de capacidad de prueba alta y 4) las pasadas de cromatografía de reparto débil óptimas.

La Figura 7 muestra un diagrama de contorno del  $K_p$  frente al pH y la concentración de cloruro total del conjunto de datos de concentración baja, tal como se describe en el Experimento 1.1.

La Figura 8 muestra la retirada de proteína A en función del coeficiente de reparto,  $K_p$ , tal como se describe en el Experimento 1.1. El valor log de retirada aumenta con el  $K_p$ . El modo de flujo continuo se indica en el cuadro discontinuo con "FC", mientras que el modo de reparto débil se indica en el cuadro discontinuo con "RD".

La Figura 9 muestra un diagrama de contorno del  $K_p$  de  $\log_{10}$  frente al pH y el log de la concentración de cloruro total, tal como se describe en el Experimento 2.1.

La Figura 10 muestra, (A) en el caso de Mab-AAB, los perfiles de avance de la proteína de célula hospedadora en función del  $K_p$  en la cromatografía de intercambio de iones; y, (B) en el caso de Mab-AAB, el avance de la proteína A en función del  $K_p$  en la cromatografía de intercambio de iones.

La Figura 11 muestra, en el caso de Mab-MYA, la ventana de operación óptima de la cromatografía de reparto débil en la hidroxapatita. El  $K_p$  óptimo en este ejemplo es entre 1,5 y 20.

La Figura 12 muestra, en el caso de Mab-A5T4, la ventana de operación óptima de la cromatografía de reparto débil en la hidroxapatita. El  $K_p$  óptimo en este ejemplo es entre 2 y 20.

La Figura 13 muestra, en el caso de Mab-MYO, la ventana de operación óptima de la cromatografía de reparto débil en la hidroxapatita. El  $K_p$  óptimo en este ejemplo es entre 5 y 20.

**Descripción detallada de la invención****A. Definiciones**

Con el fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, en primer lugar, se definen determinados términos/expresiones. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

La expresión "modo de flujo continuo" se refiere a una técnica de separación de preparación de producto en la que al menos un producto contenido en la preparación está destinado a fluir a través de una resina o un medio cromatográfico, al tiempo que al menos un posible contaminante o impureza se une a la resina o el medio cromatográfico. Generalmente, el coeficiente de reparto de producto del modo de flujo continuo es de menos de 0,1 y la concentración de producto unido es de  $< 1$  mg/ml. El "modo de flujo continuo" es una operación isocrática.

La expresión "modo de unión-elución" se refiere a una técnica de separación de preparación de producto en la que al menos un producto contenido en la preparación se une a una resina o un medio cromatográfico. Generalmente, el coeficiente de reparto de producto del modo de unión-elución es mayor de 20 y las concentraciones de producto unido son entre 1 y 20 mg/ml. El producto unido en este modo se eluye durante la fase de elución.

La expresión "modo de reparto débil" se refiere a una técnica de separación de preparación de producto en la que al menos un producto contenido en la preparación y al menos un contaminante o una impureza se unen ambos a una resina o un medio cromatográfico. La unión del producto en modo de reparto débil es de al menos 1 mg de producto por ml de resina o medio cromatográfico. Generalmente, el coeficiente de reparto de producto del modo de reparto débil es de al menos 0,1. El "modo de reparto débil" es una operación isocrática.

La expresión "coeficiente de reparto" ( $K_p$ ) se refiere a la relación de equilibrio de la concentración del producto absorbido por la resina ( $Q$ ) respecto a la concentración del producto en la solución ( $c$ ), en las condiciones especificadas de pH y composición de solución. El coeficiente de reparto  $K_p$  también se relaciona con las isotermas de adsorción de producto, tal como se muestra en la Figura 1. El coeficiente de reparto  $K_p$  corresponde a la pendiente de la isoterma de adsorción de producto a concentraciones de solución muy bajas. Se relaciona con la capacidad máxima de la siguiente manera:

$$K_p = \frac{Q}{C} = \frac{Q_{m\acute{a}x}}{K_d}$$

en la que  $Q_{m\acute{a}x}$  es la capacidad máxima de la resina en el producto y  $k_d$  es la constante de disociación en la interacción de 'resina-producto'. El coeficiente de reparto se mide típicamente con una técnica de unión de lotes, pero otras

técnicas, tales como la cromatografía isocrática, se pueden usar.

La expresión "producto unido" (Q) se refiere a la cantidad de producto que se une a la resina cuando está en equilibrio con una corriente de alimentación.

5 El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma y abarca cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno. El término incluye, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, de injerto y generados *in vitro*. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno. Típicamente, tales fragmentos podrían comprender un dominio de unión a antígeno.

10 En determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo es uno que comprende una región C<sub>H2</sub>/C<sub>H3</sub> y, por lo tanto, es susceptible a la purificación mediante cromatografía de proteína A. La expresión "región C<sub>H2</sub>/C<sub>H3</sub>" se refiere a aquellos restos de aminoácidos en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la proteína A. En algunas realizaciones, la región C<sub>H2</sub>/C<sub>H3</sub> comprende una región C<sub>H2</sub> intacta seguida de una región C<sub>H3</sub> región intacta y, en otras realizaciones, comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Los ejemplos de proteínas que contienen una región C<sub>H2</sub>/C<sub>H</sub> incluyen anticuerpos, inmunoadhesiones y proteínas de fusión que comprenden una proteína de interés fusionada o conjugada con una región C<sub>H2</sub>/C<sub>H3</sub>.

15 El término "carga" se refiere a cualquier material de carga que contenga el producto, ya sea derivado de un cultivo celular clarificado o un medio acondicionado para la fermentación, o un producto intermedio parcialmente purificado derivado de una etapa de cromatografía. La expresión "fluido de carga" se refiere a un líquido que contiene el material de carga, para su paso a través de un medio en las condiciones de operación de la invención.

20 El término "impureza" se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, incluyendo una macromolécula biológica, tal como un ADN, un ARN o una proteína, aparte de la proteína de interés que se purifica, que también está presente en una muestra de la proteína de interés que se purifica. Las impurezas incluyen, por ejemplo, variantes de proteína, tales como proteínas agregadas, especies de peso molecular alto, especies y fragmentos de peso molecular bajo y especies desamidadas; otras proteínas de las células hospedadoras que secretan la proteína que se purifica (proteínas de células hospedadoras); proteínas que forman parte de un absorbente usado para la cromatografía de afinidad que se puede lixiviar en una muestra durante las etapas de purificación anteriores, tales como la proteína A; endotoxinas; y virus.

25 La expresión "lavado esencialmente isocrático" se refiere a una solución que varía solo ligeramente del fluido de carga en términos de composición o pH.

La expresión "efluente de columna" se refiere al líquido que sale del medio o la columna durante el ciclo de carga o en el período en el que se aplica la carga.

30 La expresión "prueba de carga" se refiere a la masa total del producto cargada en la columna en el ciclo de carga de una etapa de cromatografía o aplicada a la resina en la unión de lotes, medida en unidades de masa de producto por unidad de volumen de resina.

La expresión "valor log de retirada" (VLR) se refiere al log(base 10) de la relación de la masa de impureza en la carga de una etapa de purificación respecto a la masa de impureza en el agrupamiento de productos.

35 El término "cromatografía isocrática" se refiere a la operación de una columna cromatográfica con un disolvente que no cambia la resistencia durante el período de interés.

## B. Descripción del procedimiento

La presente invención proporciona procedimientos para la recuperación de productos purificados de un fluido de carga que contiene una o más impurezas. La invención tiene aplicación en la preparación a gran escala de proteínas con fines terapéuticos y de diagnóstico.

### 45 1. Modo de reparto débil

Los solicitantes han hallado, sorprendentemente, que mediante la operación en un modo cromatográfico que reside en la región entre los modos convencionales de cromatografía de unión-elución y flujo continuo, se puede obtener un alto grado de reducción de impurezas, así como una alta prueba de carga de producto y recuperación de producto. Los solicitantes han denominado este modo de unión de producto intermedio el "modo de reparto débil".

50 En modo de reparto débil, un fluido de carga que contiene un producto de interés y una o más impurezas se hace pasar a través de un medio cromatográfico, uniéndose tanto el producto como las impurezas al medio. Sin embargo, las impurezas se unen más fuertemente al medio que el producto y, a medida que continúa la carga, el producto no unido se hace pasar a través del medio y se recupera del efluente de columna. El medio, opcionalmente, se lava posteriormente en condiciones isocráticas para recuperar el producto débilmente unido adicional del medio y el

producto purificado de cualquier lavado esencialmente isocrático se agrupa con el producto purificado del efluente de columna durante el ciclo de carga.

De acuerdo con la invención, el modo de reparto débil se define mediante las condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio. En una realización, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 5 mg de producto por ml de medio. En otra realización, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 10 mg de producto por ml de medio. En otra realización, las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 20 mg de producto por ml de medio.

En determinadas realizaciones de la invención, la masa total de producto unida al medio es de al menos el 10 % de la masa total de producto cargada en el medio. En algunas realizaciones, la masa total de producto unida al medio es de al menos el 20 % de la masa total de producto cargada en el medio. En otras realizaciones, la masa total de producto unida al medio es de al menos el 30 % de la masa total de producto cargada en el medio.

De acuerdo con la invención, el modo de reparto débil también se define mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1. En algunas realizaciones, la operación en modo de reparto débil comprende operar en condiciones definidas mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 20,0. En determinadas realizaciones, la operación en modo de reparto débil comprende operar en condiciones definidas mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10,0. En otras realizaciones, la operación en modo de reparto débil comprende operar en condiciones definidas mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0. En otras realizaciones, la operación en modo de reparto débil comprende operar en condiciones definidas mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0. En otras realizaciones más, la operación en modo de reparto débil comprende operar en condiciones definidas mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5.

Al menos una realización de la presente invención proporciona las condiciones de operación en modo de reparto débil que hacen que el medio se una al menos a entre 1 y aproximadamente 70 mg de producto por ml de medio y que se definen mediante un coeficiente de reparto de 0,3 a 20.

La Figura 1 muestra las isotermas de adsorción de producto en los modos de unión-elución, flujo continuo y reparto débil, siendo la unión de producto del modo de reparto débil claramente intermedia en comparación con los modos de unión-elución y flujo continuo. Debido a que el valor del coeficiente de reparto de producto ( $K_p$ ) es la relación de la concentración del producto adsorbido respecto a la concentración del producto en solución, los valores de  $K_p$  del modo de reparto débil también son intermedios a los valores de los modos de unión-elución y flujo continuo.

La Figura 2A representa las regiones de reparto en los modos de unión-elución, reparto débil y flujo continuo en función de la resistencia iónica, que muestran que el  $K_{imp}$  es más alto en el modo de reparto débil que en el modo de flujo continuo. En las condiciones de unión más estrictas del modo de reparto débil, se puede lograr una capacidad de producto más alta, más alta que el modo de flujo continuo, ya que las impurezas se unen más fuertemente, y más alta que el modo de unión-elución, ya que el producto se une muy débilmente en comparación con las impurezas y no absorbe la mayor parte de la capacidad de resina. El coeficiente de reparto de impurezas ( $K_{imp}$ ) es más alto en condiciones de unión más estrictas, lo que da como resultado concentraciones más bajas de impurezas residuales en el agrupamiento de productos del modo de reparto débil en comparación con el agrupamiento de productos del modo de flujo continuo. Las regiones de flujo continuo, reparto débil y unión-elución en la hidroxiapatita, en función de la concentración de fosfato y NaCl, se muestran en la Figura 2B.

La Tabla A resume las diferencias en las características entre los tres modos de unión: unión-elución (U-E), reparto débil (RD) y flujo continuo (FC).

Tabla A: características de los modos de FC/RD/U-E			
	FC	RD	U-E
<b><math>K_p</math></b>	<0,1	0,1 - 20	>20
<b>Limitación de prueba de carga</b>	Impurezas a 10-50 mg de prod./ml (típico), pero, en realidad, depende de la pureza de carga	Impurezas a 50-500 mg de prod./ml (típico), pero, en realidad, depende de la pureza de carga	Producto + impurezas < 100 mg de prod./ml
<b>Volumen de carga</b>	Moderado, de 10 - 20 VC de impurezas diluidas	Muy alto, de hasta 50 VC de impurezas diluidas	Más bajo, ya que se une el producto, además de 5-20 VC de impurezas
<b>[Producto] en eluido de carga</b>	Igual a la concentración de carga durante gran parte de la carga	Disminución inicial, a continuación, igual a la concentración de carga durante gran parte de la carga	<5 % de concentración de carga

(continuación)

Tabla A: características de los modos de FC/RD/U-E			
	FC	RD	U-E
<b>K<sub>p</sub></b>	<0,1	0,1 - 20	>20
<b>[Impureza] residual</b>	Baja	Muy baja	Depende de las condiciones de elución, el volumen de agrupamiento y la capacidad.
<b>Producto unido (Q)</b>	< 1 mg/ml	< 10 - 20 mg/ml	> 10 - 20 mg/ml
<b>Región de operación</b>	Intervalo relativamente amplio de condiciones	Ventana de operación moderada entre los modos de FC y U-E	Condiciones de unión estrictas para la carga, amplio intervalo de condiciones de elución
<b>Fase/s móviles</b>	Isocrática/s	Isocrática/s	Cambio en la composición de tampón después de la carga que causa la elución.

El modo de reparto débil también se puede distinguir de los modos de unión-elución y flujo continuo mediante sus cromatogramas, tal como se muestra en la Figura 3. En principio, los cromatogramas de los modos de flujo continuo y reparto débil pueden parecer bastante similares, el producto se recupera en el efluente de columna y las fracciones de lavado, en condiciones isocráticas. Sin embargo, existen distinciones sutiles, pero significativas, en los cromatogramas que se pueden usar para distinguir estos modos, tal como se muestra en la Figura 4. Existe un retardo en el perfil de avance inicial ( $> 0,1$  volúmenes de columna o VC) en el modo de reparto débil en comparación con el modo de flujo continuo. Existe un perfil de lavado más lento en el modo de reparto débil. Puede estar presente un pequeño pico de extracción que contiene producto (que corresponde a la resina que se sigue uniendo al 10 - 50 % de la concentración de producto de carga después de la fase de lavado), que se puede recuperar de la resina mediante la aplicación de un lavado de 1 - 5 VC después de la carga en condiciones isocráticas, después de la recuperación del efluente de columna durante el ciclo de carga.

La Figura 5A muestra las tendencias generales en el VLR de contaminante en diversos niveles de los valores del coeficiente de reparto de producto. Los VLR de contaminante son relativamente bajos en condiciones de  $K_p$  correspondientes a operaciones de flujo continuo. La operación en condiciones de aumento de  $K_p$  aumenta significativamente los VLR en las fracciones de efluente de columna antes del avance de contaminante. Tal como se muestra en los Ejemplos, la operación a valores de  $K_p$  más altos mejora los VLR de contaminante en hasta 2 log de aquellos correspondientes a las condiciones de flujo continuo convencionales.

El aumento de  $K_p$  típicamente aumenta la unión de tanto el producto como el contaminante a la resina. La unión más fuerte del contaminante a un  $K_p$  más alto conduce a un VLR mayor en las fracciones de efluente de columna antes del avance de contaminante. Sin embargo, la prueba de carga en el punto del avance de contaminante disminuye con el aumento de  $K_p$  a medida que el producto comienza a competir con el contaminante por los sitios de unión en la resina, tal como se representa esquemáticamente en la Figura 5A mediante la curva de  $K_p$  alto. Por lo tanto, la región de reparto débil corresponde a una ventana de operación que equilibra la mejora en el VLR de contaminante con los requisitos de capacidad de columna en una separación dada.

El límite de  $K_p$  superior en la cromatografía de reparto débil también depende de la prueba de carga de columna, tal como se muestra en la Figura 5B. El coeficiente de reparto no tiene ningún impacto en la recuperación de producto a los valores que delimitan las condiciones de flujo continuo. La recuperación de producto comienza a descender a valores de  $K_p$  altos cuando las condiciones de lavado isocrático no son eficaces en el lavado del producto unido retirado de la columna en un número razonable de volúmenes de lavado. El grado de pérdida de producto debido al lavado ineficaz depende de la prueba de carga, así como la naturaleza y proporción de contaminante en la carga. Por tanto, el límite inferior de la región de RD se define mediante los requisitos de retirada de contaminante, mientras que el límite superior en una prueba de carga dada se define mediante las restricciones de la recuperación o capacidad de producto.

En una o más realizaciones de la invención, las condiciones de reparto débil óptimas se pueden identificar usando la siguiente secuencia de experimentos, tal como se muestra en la Figura 6:

- (i) se realiza un cribado CAP (o experimentos de unión de lotes convencionales) para determinar los coeficientes de reparto de producto  $K_p$  en función de las condiciones de operación. Se identifica la ventana de operación correspondiente a la región de reparto débil ( $0,1 < K_p < 20$ ) a partir de estos experimentos.
- (ii) Preferentemente, después de la identificación de la región de reparto débil, se pueden realizar pasadas de exploración en una columna a pequeña escala en una prueba de carga similar a aquellas usadas en la operación de flujo continuo convencional (aproximadamente 50 mg/ml). Se puede adaptar adicionalmente la ventana de operación de reparto débil basándose en los valores de retirada de contaminante y de recuperación de producto a partir de estos experimentos.

(iii) Más preferentemente, se pueden generar, a continuación, datos de avance de contaminante en algunas condiciones de  $K_p$  dentro de la región de reparto débil. Basándose en estos resultados, se selecciona un coeficiente de reparto óptimo en la región de reparto débil que proporcione la mayor retirada de contaminantes en un prueba de carga aceptable.

5 (iv) A continuación, lo más preferentemente, se pueden realizar pasadas de cromatografía de reparto débil en condiciones de  $K_p$  óptimas y adaptar adicionalmente la prueba de carga y los volúmenes de lavado, según sea necesario, para obtener una recuperación y retirada de contaminante óptimas.

10 Un experto en la materia podría usar estas pautas o una variación de las mismas para definir fácilmente una etapa de cromatografía de reparto débil que proporcione una retirada de contaminante potenciada en pruebas de carga comparables o más altas que los modos de operación de columna convencionales de flujo continuo o unión/elución. El contexto general analizado anteriormente se puede ajustar, con ajustes pequeños si los hay, para desarrollar una etapa de purificación en un sistema de intercambio de iones, de interacción hidrófoba, de hidroxiapatita o de múltiples modos que combine elementos de cualquiera o la totalidad de estas interacciones.

## 2. Técnicas de separación

15 El modo de reparto débil se puede usar junto con cualquier resina o medio cromatográfico para la separación de un producto de las impurezas. En una realización, el medio es un medio de intercambio de iones cargado. El intercambio de iones es una forma de cromatografía que separa de acuerdo con la carga neta. La separación de moléculas se produce como resultado de la competencia entre el producto cargado de interés y los contraiones por los grupos de ligando con carga opuesta en el medio de intercambio de iones. Las interacciones de unión entre el producto y un medio de intercambio de iones dependen de la carga neta del producto. La carga neta depende del pH y la resistencia iónica del medio, que afecta a las diferentes características de carga de los aminoácidos y otros componentes sobre la superficie expuesta de la/s molécula/s de producto de interés.

25 Las resinas de intercambio de iones que se pueden usar en la invención incluyen resinas de intercambio de aniones y resinas de intercambio de cationes. Las resinas de intercambio de aniones pueden emplear sustituyentes, tales como grupos dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetilo (TMAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). El intercambio de cationes puede emplear sustituyentes, tales como carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio de iones celulósicas, tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 están disponibles a través de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, Reino Unido. También se conocen intercambiadores de iones reticulados y basados en Sephadex. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM- y SP-Sephadex y DEAE-, Q-, CM- y S-Sepharose y Sepharose están disponibles todos a través de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Además, el copolímero de etilen glicol-metacrilato derivatizado derivado tanto de DEAE como de CM, tal como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM-650S o M, está disponible a través de Toso Haas Co., Filadelfia, PA.

35 En determinadas realizaciones de la invención, el modo de reparto débil se usa con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) para la purificación de producto. La CIH es una técnica para la separación de moléculas basándose en la hidrofobicidad. Generalmente, las moléculas de muestra en un tampón de alto contenido en sal se cargan en la resina de CIH. La sal en el tampón interactúa con las moléculas de agua para reducir la solvatación de las moléculas en solución, exponiendo de ese modo las regiones hidrófobas en las moléculas de muestra que, por consiguiente, se absorben mediante el medio de CIH. Cuanto más hidrófoba es la molécula, menos sal necesita para promover la unión. Las interacciones de unión entre las moléculas de producto y un medio de CIH dependen, por tanto, de condiciones, tales como el pH, la resistencia iónica y las concentraciones de sal del medio.

45 Diversas resinas de CIH disponibles en el mercado que se pueden usar en la invención incluyen resinas que comprenden una matriz de base (por ejemplo, agarosa reticulada o material de copolímero sintético) a la que se acoplan ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos alquilo o arilo). Los ejemplos incluyen Fenil SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW™ (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Fenil SEPHAROSE™ de alto rendimiento (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Octil SEPHAROSE™ de alto rendimiento (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Fractogel™ EMD Propilo o FRACTOGEL™ EMD Fenilo (E. Merck, Alemania); Soportes MACRO-PREP™ Metilo o MACRO-PREP™ t-Butilo (Bio-Rad, CA); WP HI-Propilo (C<sub>3</sub>)™ (J. T. Baker, NJ); y TOYOPEARL™ éter, fenilo o butilo (TosoHaas, PA).

50 En otras realizaciones de la invención, el modo de reparto débil se usa con la cromatografía de hidroxiapatita para la purificación de producto. La cromatografía de hidroxiapatita es una técnica que utiliza un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de Fórmula  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , como matriz y ligando. Los grupos funcionales consisten en pares de iones calcio cargados positivamente (sitios C) y acumulaciones de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones de unión entre el producto y el medio de hidroxiapatita dependen de condiciones, tales como el pH, la resistencia iónica y las concentraciones de excipiente, tales como las concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina y concentraciones de HEPES, del medio. Diversas resinas cromatográficas de hidroxiapatita están disponibles en el mercado y se pueden usar en la invención.

En realizaciones adicionales de la invención, el modo de reparto débil se usa con una resina de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (CAMI) para la purificación de producto. La CAMI se basa en la interacción entre los

iones de metales de transición quelados inmovilizados en la resina y las cadenas laterales de imidazol de los restos de histidina en el producto marcado de interés. La separación de las moléculas se produce como resultado de la competencia entre el producto marcado de interés y los contraligandos por los grupos de metales en la resina de CAMI. Las interacciones de unión entre el producto y el medio de CAMI cargado de metal dependen de condiciones, tales como los niveles de contraligando, tales como las concentraciones de imidazol, y la resistencia iónica del medio. Diversas resinas de CAMI están disponibles en el mercado y se pueden usar en la invención.

### 3. Productos para la purificación

La invención se puede usar para la purificación a escala comercial de diversos productos de interés, incluyendo proteínas naturales, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas, interleucinas, hormonas y enzimas terapéuticas. En una realización, la proteína que se somete a purificación puede comprender uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpos constantes. En una realización, la proteína también puede comprender uno o múltiples dominios de inmunoglobulina de anticuerpos variables. En otra realización, la proteína que contiene Fc puede comprender un anticuerpo. Las proteínas se pueden derivar de diversas fuentes, incluyendo líneas de células hospedadoras procariotas o eucariotas recombinantes cultivadas.

Las preparaciones de anticuerpos de la invención se pueden aislar de varias fuentes, incluyendo, pero sin limitación, sobrenadantes de suero de animales inmunizados, fluido de ascitis, hibridoma o mieloma, medios acondicionados derivados del cultivo de una línea de células recombinantes que expresa la molécula de anticuerpo y de todos los extractos celulares de células productoras de anticuerpos. En una realización de la invención, se purifican los anticuerpos de los medios de cultivo celular acondicionados de una diversidad de líneas de células recombinantes productoras de anticuerpos. Aunque se puede esperar alguna variación de una línea celular a otra línea celular y entre los diversos productos de anticuerpos, basándose en la divulgación en el presente documento, se encuentra dentro del alcance de un experto habitual en esta materia la adaptación de la invención en el presente documento a una combinación particular de proteína de anticuerpo y línea celular productora.

Únicamente con fines ilustrativos, la presente invención se aplicó a la purificación de varios anticuerpos del isotipo IgG. Más específicamente, la presente invención se aplicó a la purificación de un anticuerpo monoclonal anti-A beta humanizado, un anticuerpo anti-GDF8 y un anticuerpo monoclonal anti-IL-13 humanizado.

### 4. Condiciones y capacidades de carga

Antes de cargar el fluido que contiene el producto y las impurezas en el medio, puede resultar necesaria la identificación de la región de reparto débil mediante el hallazgo de las condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a 1 mg de producto por ml de medio. En una realización, las condiciones de operación halladas hacen que el medio se una al menos a 5 mg de producto por ml de medio. En otra realización, las condiciones de operación halladas hacen que el medio se una al menos a 10 mg de producto por ml de medio. En otras realizaciones, las condiciones de operación halladas hacen que el medio se una al menos a 20 mg de producto por ml de medio. Como alternativa, la región de reparto débil se identifica mediante el hallazgo de las condiciones de operación definidas mediante un coeficiente de reparto de al menos 0,1. En determinadas realizaciones, las condiciones de operación halladas se definen mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 20,0. En otras realizaciones, las condiciones de operación halladas se definen mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10,0. En otras realizaciones más, las condiciones de operación halladas se definen mediante un coeficiente de reparto en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0, en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 o en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5. En realizaciones adicionales, la región de reparto débil se identifica mediante el hallazgo de las condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a entre 1 y aproximadamente 70 mg de producto por ml de medio y que se definen mediante un coeficiente de reparto de 0,3 a 20.

Un experto en la materia reconocerá que las condiciones de operación adecuadas dependerán de la elección del medio seleccionado para la purificación del producto. En determinadas realizaciones, las condiciones de operación comprenden niveles de pH y resistencias iónicas. En otras realizaciones, las condiciones de operación comprenden, además, concentraciones de sal. En otras realizaciones más, las condiciones de operación comprenden, además, niveles de excipiente, tales como concentraciones de fosfato y concentraciones de calcio. En algunas realizaciones, las condiciones de operación comprenden niveles de contraligando, tales como concentraciones de imidazol, y niveles de pH.

Se puede usar una etapa de cribado para identificar las condiciones de operación del modo de reparto débil. Tal etapa de cribado podría incluir estudios de unión de lotes o estudios de unión de columnas. Los estudios de unión de columnas podrían incluir estudios de elución de gradiente o estudios de elución isocrática. Por ejemplo, un experto en la materia puede determinar qué tampón o sal son adecuados para la proteína particular que se purifica y para las condiciones de operación que se identifican. A continuación, se puede determinar la concentración óptima del tampón o la sal seleccionados mediante, por ejemplo, la pasada de un gradiente del tampón o la sal seleccionados a través de una columna a la que se ha aplicado un fluido de carga que comprende el producto a purificar y las impurezas. Las fracciones del efluente de la columna se pueden recoger y analizar para determinar la concentración de tampón o sal

a la que la unión de producto es de al menos 1 mg de producto por ml de medio o, como alternativa, a la que el coeficiente de reparto del producto es de al menos 0,1. En determinadas realizaciones de la invención, el coeficiente de reparto se mide entre 1 y 10 mg/ml de prueba de carga con una relación de fases (volumen de líquido respecto a volumen de resina) de tres a seis en un experimento de unión de lotes.

5 Una vez que se determinan las condiciones de operación, las condiciones del fluido y/o medio de carga se pueden ajustar en consecuencia. Por ejemplo, el medio se puede equilibrar mediante su lavado con una solución que lo lleve a las condiciones de operación necesarias del modo de reparto débil. El fluido de carga también se puede intercambiar con tampón hasta dar un tampón adecuado o un tampón de carga en la preparación para un modo de reparto débil. El tampón de carga puede ser el mismo que o un tampón diferente al tampón de equilibrio.

10 En una realización, la resistencia iónica del fluido de carga es de no más de 100 mM. En otra realización, la resistencia iónica del fluido de carga es de no más de 50 mM. En otra realización, la resistencia iónica del fluido de carga es de no más de 25 mM. En otra realización más, la resistencia iónica del fluido de carga es de no más de 10 mM.

15 El fluido de carga se puede hacer pasar a través de un medio de separación que se empaqueta en una columna de lecho, se empaqueta en una columna de lecho fluidizado/expandido que contiene la matriz de fase sólida y/o en un formato de lotes en el que la matriz de fase sólida se mezcla con el fluido de carga durante un determinado tiempo. Después de hacerse pasar el fluido de carga a través del medio, el medio se lava opcionalmente con un volumen de lavado esencialmente isocrático. El producto purificado se puede obtener a partir de cualquier lavado esencialmente isocrático y agrupar con el producto purificado del efluente de columna durante el ciclo de carga. Después de la etapa de lavado opcional, el medio, opcionalmente, se puede extraer y regenerar. Este procedimiento, típicamente, se realiza  
20 regularmente para minimizar la acumulación de impurezas sobre la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar el medio para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

25 Las concentraciones de carga y los volúmenes de carga altos son posibles con el modo de reparto débil. En una realización, la concentración de producto en el fluido de carga es de al menos 1 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra realización, la concentración de producto en el fluido de carga es de al menos 5 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra realización, de al menos 50 mg de producto por ml de fluido de carga y, en otra realización, de al menos 100 mg de producto por ml de fluido de carga. El producto purificado se puede recuperar de hasta 50 VC de fluido de carga que se ha hecho pasar a través del medio.

30 Las pruebas de carga altas también son posibles con el modo de reparto débil. En una realización, la carga en el medio puede ser en una prueba de carga de al menos 10 mg de producto por ml de medio. En otras realizaciones, la carga del producto en el medio es de al menos 50 mg de producto por ml de medio. Es determinadas realizaciones, la carga del producto en el medio es de al menos 100 mg de producto por ml de medio. En otras realizaciones, la carga en el medio puede ser en una prueba de carga de al menos 500 mg de producto por ml de medio. En otras realizaciones más, la carga en el medio puede ser en una prueba de carga de al menos 1.000 mg de producto por ml de medio.

### 35 **5. Retirada de impurezas**

Se ha mostrado que el modo de reparto débil es útil para la retirada de todo tipo de impurezas de las preparaciones de producto, incluyendo las proteínas de células hospedadoras, los ácidos nucleicos, las variantes de producto, incluyendo las especies de peso molecular alto y producto agregado, las endotoxinas, los virus y los contaminantes de la proteína A de las etapas de purificación anteriores.

40 En una realización de la invención, la concentración de proteínas de células hospedadoras presente en el producto purificado es de no más de aproximadamente 500 ng de proteínas de células hospedadoras por mg de producto. En otras realizaciones, la concentración de proteínas de células hospedadoras se puede reducir hasta no más de 250 ng por mg de producto y, en otras realizaciones, hasta no más de 100 ng por mg de producto. En determinadas realizaciones, el valor log de retirada de las proteínas de células hospedadoras es de al menos 1,0, en otras  
45 realizaciones, el valor log de retirada de las proteínas de células hospedadoras es de al menos 2,0 y, en otras realizaciones, el valor log de retirada de las proteínas de células hospedadoras es de al menos 3,0.

50 En una realización de la invención, la concentración de proteína A presente en el producto purificado es de no más de aproximadamente 100 ng de proteína A por mg de producto. En algunas realizaciones, la concentración de proteína A se puede reducir hasta no más de 50 ng por mg de producto y, en otras realizaciones, hasta no más de 10 ng por mg de producto. En determinadas realizaciones, el valor log de retirada de la proteína A es de al menos 1,0 y, en otras realizaciones, el valor log de retirada de la proteína A es de al menos 2,0 y, en otras realizaciones, el valor log de retirada de la proteína A es de al menos 3,0.

55 En otra realización de la invención, las impurezas víricas se retiran del producto purificado. En determinadas realizaciones, el valor log de retirada de los virus es mayor de 1,0, en otras realizaciones, mayor de 2,0 y, en otras realizaciones, mayor de 3,0.

En algunas realizaciones de la invención, las impurezas de ácido nucleico se retiran del producto purificado. En determinadas realizaciones, la cantidad de ácidos nucleicos presente en el producto purificado se puede reducir hasta

no más de 1 ng de ácidos nucleicos por mg de producto.

En realizaciones adicionales, la concentración de las variantes de proteína en el producto purificado es de no más de aproximadamente el 10 %. En algunas realizaciones, la concentración de las variantes de proteína se puede reducir hasta no más de aproximadamente el 5 %, en algunas realizaciones, hasta no más del 2 % y, en algunas realizaciones, hasta no más del 0,5 %.

En las condiciones de unión estrictas del modo de reparto débil, el medio de separación retira al menos el 90 % de las impurezas de la proteína de célula hospedadora, del ácido nucleico, de la variante de proteína, de la endotoxina y de la proteína A. En algunas realizaciones, el medio retira al menos el 99 % de las impurezas y, en otras realizaciones, el medio retira al menos el 99,9 % de las impurezas.

## 6. Etapas opcionales adicionales

El procedimiento de purificación de la invención se puede usar en combinación con otras etapas de purificación de proteínas. En una realización de la invención, pueden resultar deseable que se den una o más etapas que precedan a la etapa de reparto débil para reducir la prueba de carga. En otra realización de la invención, puede resultar deseable que se den una o más etapas de purificación después de la etapa de reparto débil para retirar los contaminantes o las impurezas adicionales.

El procedimiento de purificación de reparto débil descrito se puede combinar, opcionalmente, con otras etapas de purificación, incluyendo, pero sin limitación, la cromatografía de proteína A, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado, la cromatografía de exclusión por tamaños, la diafiltración, la ultrafiltración, la filtración de retirada vírica y/o la cromatografía de intercambio de iones. Las etapas de purificación opcionales que preceden y/o siguen a la etapa de reparto débil también se pueden operar en modo de reparto débil o en otros modos, tales como el modo de unión-elución o el modo de flujo continuo.

En una realización, antes de la etapa de purificación de reparto débil, los medios de obtención, opcionalmente, se pueden purificar inicialmente mediante una etapa de cromatografía de proteína A. Por ejemplo, se puede emplear PROSEP-A™ (Millipore, Reino Unido), que consiste en la proteína A acoplada covalentemente a un vidrio de poro controlado. Otras formulaciones útiles de proteína A incluyen Proteína A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), TOYOPEARL™ 650M Proteína A (TosoHaas Co., Filadelfia, PA) y columnas MABSELECT™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

## 7. Tampones de iones híbridos usados en tándem con la cromatografía de proteína A y la cromatografía de intercambio de iones

En determinadas realizaciones, un fluido que contiene producto se eluye de una columna de proteína A usando un tampón de elución de resistencia iónica baja. El pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan, a continuación, usando un tampón de neutralización, que da como resultado no más de 20 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto. El fluido de carga resultante se hace pasar, a continuación, a través de un medio de intercambio de aniones o un medio de hidroxapatita que opera en condiciones de modo de reparto débil. En determinadas realizaciones, el fluido de carga se hace pasar a través de un medio de intercambio de aniones sin necesidad de diafiltración. En algunas realizaciones, el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan usando un tampón de neutralización que da como resultado no más de 40 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto. En otras realizaciones, el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan usando un tampón de neutralización que da como resultado no más de 60 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto. En otras realizaciones más, el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan usando un tampón de neutralización que da como resultado no más de 80 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto.

Los tampones que se pueden usar para la elución de la columna de proteína A incluyen tampones que comprenden moléculas con un grupo aniónico cargado con un pKa de 2-5. Tales tampones de elución podrían comprender, además, moléculas con un grupo catiónico cargado con un pKa de 6,5-10. En una realización, el tampón de elución comprende moléculas que son iones híbridos a pH entre 4 y 9, tales como glicina; 1,4-piperazinbis-(ácido etanosulfónico); glicilglicina; ácido ciclopentanotetra-1,2,3,4-carboxílico; ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico; ácido 2-(N-morfolino)propano-sulfónico; ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico; ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropano sulfónico; N-tris(hidroximetil)metilglicina; glicinamida; N,N-bis(2-hidroxietil)glicina; ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminopropano sulfónico; o N-glicil-glicina.

La elución de una columna de proteína A con un tampón de ion híbrido proporciona la ventaja de una resistencia iónica baja con algún grado de neutralización. La resistencia iónica baja del tampón no afecta negativamente a la operación de las columnas de intercambio de iones posteriores, incluyendo las columnas de hidroxapatita. Los niveles altos de resistencia iónica disminuirán la unión de las impurezas a las columnas de intercambio de iones, lo que puede disminuir la eficacia global de la purificación. Se prefieren soluciones de resistencia iónica más baja para las cargas en las columnas de intercambio de iones, ya que la resistencia iónica se puede elevar fácilmente con la adición de soluciones salinas concentradas; la disminución de la resistencia iónica de las soluciones no es fácil. Sorprendentemente, existen tampones que tienen un pKa bajo que permiten su uso a niveles de pH bajos útiles en las etapas de elución de proteína

A, pero que también tienen un segundo pKa que permiten su uso a niveles de pH más altos útiles en la cromatografía de intercambio de iones; estos tampones, si se usan a un segundo pH adecuado, tienen poca carga eficaz durante la operación de la etapa de intercambio de iones posterior a la etapa de proteína A.

5 Un tampón de ion híbrido que tiene un pKa cercano al del pH de elución preferido para la proteína A (entre pH 2 y 5, preferentemente entre 2,5 y 4,0) permite que el tampón se use para mantener el pH cercano al pH del tampón y para eluir la columna. Los tampones de iones híbridos que también tienen un pKa cercano al de la operación de una columna de intercambio de iones posterior (pH 5,5 a 11) podrían permitir que el tampón controle el pH en este intervalo de pH, así como en el intervalo de pH de la elución de proteína A. El uso de un compuesto individual tanto para la elución de la columna de proteína A a pH bajo como para el mantenimiento del pH más alto útil en la cromatografía de intercambio de iones simplifica la operación de ambas etapas y también simplifica la composición del agrupamiento de productos después de la neutralización.

15 En una realización adicional de la invención, un tampón de ion híbrido con pKa1 y pKa2 puede eluir una columna de proteína A a niveles de pH dentro de una unidad de pH de pKa1. Además, si el agrupamiento de proteína A se neutraliza con una solución básica del tampón de ion híbrido hasta un segundo pH dentro de una unidad de pH de pKa2, el tampón de ion híbrido podrá mantener el pH de la solución. Si el segundo pH está por debajo del de pKa2, el tampón sigue siendo de ion híbrido y aporta poco a la resistencia iónica global de la solución. Por ejemplo, un tampón de ion híbrido con una concentración  $x$  a un pH igual al pKa2 aportará a la resistencia iónica global únicamente  $x/2$ . Un tampón de ion híbrido con una concentración  $x$  a 1 unidad de pH por debajo del pKa2 del tampón tendrá una resistencia iónica de una décima parte de  $x$ . Esta reducción en la resistencia iónica es significativamente útil para la operación de la cromatografía de intercambio de iones.

20 La existencia de tampones que tienen un pKa1 útil para la elución de las columnas de proteína A y un pKa2 útil para la operación de la cromatografía de intercambio de iones no resulta evidente, ya que el pKa1 de estos tampones no se indica comúnmente. Los tampones se usan comúnmente a niveles de pH cercanos al de pKa2 y aquellos expertos en la materia de la cromatografía no saben que son útiles para la elución de una columna de proteína A. Además, aunque generalmente no se aprecia la utilidad de estos tampones para la elución de las columnas cromatográficas de proteína A, tampoco se aprecia que estos tampones de iones híbridos podrían tener una utilidad adicional como tampones para las columnas de intercambio de iones posteriores a las columnas de proteína A porque aportan menos resistencia iónica al agrupamiento de proteína A neutralizada.

### C. Ejemplos

30 Los siguientes Ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos.

Se proporcionan ejemplos de tres modos de cromatografía (intercambio de aniones, interacción hidrófoba e hidroxapatita), que usan tres anticuerpos monoclonales diferentes. Se describen cuatro series separadas de experimentos, representando cada una un emparejamiento diferente del modo de cromatografía y el anticuerpo monoclonal a purificar. En primer lugar, se presentan los estudios de cribado iniciales, que determinan el coeficiente de reparto y/o la concentración del producto unido a la resina en diversas condiciones de solución, definiendo así las regiones de operación de los modos de reparto débil (RD) y flujo continuo (FC). A continuación, se resumen varios estudios de columna, con datos sobre la recuperación de producto y retirada de impurezas. Las recuperaciones de producto son excelentes en las pasadas por columna de RD y los niveles de impurezas son más bajos que en los estudios de FC correspondientes. Las pasadas en RD se realizaron con pruebas de cargas más altas en la resina que los estudios de FC.

45 Los niveles de restos de proteína A en las muestras de ensayo se midieron usando un análisis de inmunsorbente ligado a enzima (EISLE) de la proteína A. La cantidad de agregado de peso molecular alto se midió usando un análisis de cromatografía de exclusión por tamaños (CET) analítico. Los niveles de proteínas de células hospedadoras (PCH) se midieron usando un EISLE de PCH. Todos los estudios de cribado y de columna se realizaron a temperatura ambiente.

#### **Serie 1: intercambio de iones usando TMAE-HiCap (M) y Mab-AAB**

##### *Experimento 1.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de RD y FC*

50 Se realizó un cribado de alta productividad (CAP) para identificar las condiciones de reparto débil y de flujo continuo de Mab-AAB con un medio de TMAE-HiCap (M). Este cribado varió la concentración de cloruro de sodio y el pH para determinar su efecto sobre el grado de unión de MAB-AAB y las impurezas relacionadas con el procedimiento (proteína A y PCH) al medio de TMAE.

55 Se añadieron 50  $\mu$ l de medio de TMAE-HiCap a cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo se equilibró en soluciones constituidas por glicina 50 mM y una cantidad variable de tampón de Tris (dependiendo de la cantidad necesaria para la neutralización hasta el pH especificado en la Tabla 1.1.1) y cloruro de sodio (especificado en la Tabla 1.1.2). El pH varió de 7,6 a 9,0 y el cloruro de sodio varió de 0 mM a 80 mM.

Las soluciones de tampón usadas en cada fila se diluyeron en un sistema de pipeteo automatizado (Tecan 100 RST).

La solución madre de los tampones se fabricó a partir de glicina 500 mM acidificada con HCl hasta pH 3,0 y, posteriormente, se neutralizó con una base de Tris 2 M hasta los niveles de pH indicados en la Tabla 1.1.1. Esta valoración dio como resultado un nivel de Tris que dependía del pH del tampón. El pH del tampón se midió a una dilución de 1 a 10 de la concentración de tampón madre, que correspondía a la dilución fabricada mediante el sistema de pipeteo automatizado. Como resultado de la acidificación de glicina hasta pH 3,0, el tampón aporta aproximadamente 10 mM de resistencia iónica a la solución final. Se hicieron dos pruebas de carga en la resina: 5 mg/ml, para medir el coeficiente de reparto, K, y 122 mg/ml, para medir la capacidad de la resina para la retirada de impurezas y el producto unido, Q, en equilibrio con una solución de proteína a una concentración aproximadamente igual a la concentración de carga de la columna.

**Tabla 1.1.1: tipo de tampón y pH diana en cada pocillo**

	Todas las columnas
<b>A</b>	Glicina 50 mM, Tris 8,8 mM, pH 7,6
<b>B</b>	Glicina 50 mM, Tris 13,6 mM, pH 7,8
<b>C</b>	Glicina 50 mM, Tris 16,0 mM, pH 8,0
<b>D</b>	Glicina 50 mM, Tris 19,6 mM, pH 8,2
<b>E</b>	Glicina 50 mM, Tris 28,4 mM, pH 8,4
<b>F</b>	Glicina 50 mM, Tris 37,2 mM, pH 8,6
<b>G</b>	Glicina 50 mM, Tris 64,0 mM, pH 8,8
<b>H</b>	Glicina 50 mM, Tris 100 mM, pH 9,0

**Tabla 1.1.2: niveles de NaCl (en mM) y pruebas de proteína (mg/ml) en cada pocillo**

Todas las filas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>NaCl (mM)</b>	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
<b>MAB-AAB (mg/ml)</b>	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

En la primera fase del experimento de CAP, cada pocillo se equilibró en las condiciones de NaCl y pH, tal como se describe en las Tablas 1.1.1 y 1.1.2, en una relación en volumen de fase de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina). La placa se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que se consiguiera el equilibrio. A continuación, se retiró la solución mediante la centrifugación de la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

En la segunda fase, la resina en cada pocillo se sometió a prueba con una solución concentrada de MAB-AAB en 5 mg/ml de resina con una relación en volumen de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina) a la concentración de NaCl y el pH adecuados. Una solución de 36 mg/ml de Mab-AAB en HEPES 1 mM, NaCl 10 mM, a pH 7,0, enriquecida con 300 ppm de proteína A se usó como solución madre. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que la resina y la solución se equilibraran. El sobrenadante se retiró de la placa de filtro mediante centrifugación y se recogió en una placa de recogida. La concentración de proteína en el sobrenadante en cada pocillo se determinó mediante absorbancia a A280 nm.

En la tercera fase, la resina se lavó mediante la adición de soluciones de las condiciones especificadas de NaCl y pH enumeradas en la Tabla 1.1.2. El sobrenadante se retiró después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta fase, se añadió NaCl 2 M para retirar la proteína restante que se unió a la resina. Los coeficientes de reparto se calcularon en cada pocillo usando la masa eluida de las Fases 3 y 4 y la concentración de producto de la Fase 2 y se muestran en la Tabla 1.1.3. En la Figura 7, se muestra un diagrama de contorno del log del coeficiente de reparto en función del pH y el cloruro.

**Tabla 1.1.3: coeficientes de reparto (K) para el cribado CAP de 96 pocillos de MAB-AAB**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,22	0,32	0,35	0,17	0,24	0,23	0,21	0,24	0,21	0,19	0,17	0,16
<b>B</b>	0,37	0,36	0,38	0,25	0,24	0,08	0,28	0,26	0,22	0,24	0,18	0,16
<b>C</b>	0,63	0,48	0,47	0,27	0,15	0,20	0,31	0,28	0,26	0,20	0,23	0,16
<b>D</b>	1,24	1,12	0,68	0,36	0,30	0,17	0,42	0,39	0,34	0,23	0,23	0,18
<b>E</b>	3,24	1,89	1,05	0,59	0,35	0,15	0,68	0,58	0,41	0,29	0,21	0,18
<b>F</b>	8,37	3,37	1,56	0,61	0,31	0,32	0,87	0,74	0,51	0,32	0,25	0,21
<b>G</b>	18,36	9,49	3,16	0,82	0,49	0,34	0,91	0,88	0,69	0,39	0,24	0,20
<b>H</b>	125,73	23,79	6,58	1,23	0,58	0,43	1,18	1,02	0,78	0,42	0,27	0,24

Tal como se muestra en la Tabla 1.1.3, el valor de Kp se puede usar para describir regiones en las que MAB-AAB se une al medio de TMAE con diferentes resistencias. Estas regiones se visualizan más claramente en la Figura 7. La resistencia de la unión de MAB-AAB al medio de TMAE se puede manipular mediante la variación de las condiciones de concentración de cloruro y pH en las zonas de flujo continuo ( $K < 0,1$ ), reparto débil ( $0,1 < K < 20$ ) y unión ( $K > 20$ ).

El sobrenadante de la fase de carga de todos los pocillos de cada zona se muestreó y se sometió a examen de proteína A. Los resultados del análisis de estas muestras se resumen en la Tabla 1.1.4. Existe una región de pH y conductividad

en la que la etapa de cromatografía de TMAE proporciona una retirada muy significativa de la proteína A con una pérdida de proteína limitada en la resina. Se halló que esta región estaba estrechamente correlacionada con el valor de coeficiente de reparto,  $K_p$ , y no con ninguna concentración de cloruro o pH específicos (véase la Figura 8).

**Tabla 1.1.4: valores log de retirada (VLR) de la proteína A de los datos de unión de MAB-AAB a partir del cribado CAP**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2,11	1,89	2,12	1,85	1,22	1,00	1,63	1,02	1,00	0,92	0,85	1,02
<b>B</b>	2,79	2,37	2,42	1,96	1,23	1,13	1,77	1,81	1,22	0,85	0,94	1,52
<b>C</b>	>3,05	>3,03	2,74	2,16	1,37	1,11	2,25	2,15	1,96	1,16	1,06	0,95
<b>D</b>	>3,41	>2,98	>3,06	2,50	1,94	1,18	3,39	3,11	2,57	1,41	1,02	0,89
<b>E</b>	>2,87	>2,93	>3,01	>2,95	2,13	1,75	>3,09	3,27	3,09	1,66	1,89	0,99
<b>F</b>	>2,64	>2,89	>2,99	>3,11	2,29	1,82	>3,07	>3,11	>3,15	2,19	1,24	0,84
<b>G</b>	>2,33	>2,58	>2,89	>3,07	2,41	2,14	>3,09	>3,11	>3,14	2,80	1,46	0,85
<b>H</b>	>1,63	>2,36	>2,76	>3,01	2,86	2,37	>2,98	>3,05	>3,15	3,16	3,45	0,85

*Experimento 1.2: pasadas por columna en condiciones de flujo continuo*

El siguiente experimento se realizó en el modo de flujo continuo (FC), en el que Mab-AAB interactúa únicamente muy débilmente con la columna. Se realizaron dos pasadas con pruebas de carga de 110 mg/ml y 200 mg/ml de resina.

En todas las pasadas de cromatografía de intercambio de aniones de TMAE (HiCapM) descritas en los experimentos de la Serie 1 se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

Caudal operativo: 150 - 300 cm/h

Equilibrio 1: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Equilibrio 2: tal como se especifica, aproximadamente equivalente al contenido de cloruro y pH de carga

Lavado posterior a la carga: tal como se especifica, aproximadamente equivalente al contenido de cloruro y pH de carga

Tampón de extracción: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Cromatografía de proteína A de MabSelect

El cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó a escala piloto usando una columna MabSelect (2.389 ml) conectada a un sistema de cromatografía Millipore K-prime 400. Una columna de proteína A de MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM/NaCl 150 mM, a pH 7,5, a un caudal de 300 cm/h. A continuación, se cargó la columna a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. A esto le siguió un lavado de 5 VC en NaCl 1 M, Tris 50 mM, a pH 7,5 y un lavado de 5 VC que contenía Tris 10 mM, NaCl 75 mM, lavado a pH 7,5. A continuación, se eluyó la columna usando glicina 50 mM, NaCl 75 mM, a pH 3,0. El agrupamiento de productos se neutralizó hasta pH 7,6 usando Tris 2 M a pH 8,5. El pico neutralizado tenía una concentración de cloruro de aproximadamente 90 mM.

Cromatografía de TMAE HiCap (M)

El agrupamiento de proteína A neutralizada se purificó adicionalmente en la etapa de TMAE con las soluciones de equilibrio, carga y lavado a pH 7,5 con Tris 50 mM y cloruro de sodio 75 mM. Se usaron 5 volúmenes de columna de lavado. Las dimensiones de columna y las pruebas de carga de estos dos estudios fueron: Pasada 1: 7,0 cm de diámetro x 20,6 cm de altura de lecho (volumen: 793 ml) con una concentración de carga de 11,9 mg/ml y Pasada 2: 7,0 cm de diámetro x 13 cm de altura de lecho (volumen: 500 ml) con una concentración de carga de 17,6 mg/ml.

Estas condiciones de carga estaban en la región de flujo continuo (FC) (Tabla 1.2.1). Los estudios de unión de lotes se usaron para medir el coeficiente de reparto ( $K_p$ ) y el producto unido se determinó mediante la proteína en la extracción de columna mediante el uso de absorbancia UV. Este procedimiento de determinación del producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la elución isocrática del producto durante el lavado. Se midieron los niveles de proteína A, PCH y PMA en la carga y el agrupamiento de productos y se calculó el grado de retirada. Los resultados se presentan en la Tabla 1.2.1. Existe una retirada deficiente de proteína A y PMA y una reducción moderada en los niveles de PCH.

**Tabla 1.2.1: retirada de PCH, proteína A y PMA en condiciones de flujo continuo**

Pasada	Prueba de carga (mg/ml)	Coefficiente de reparto ( $K_p$ )	Producto unido (mg/ml de resina)	PCH (VLR)	Proteína A (VLR)	PMA (veces)	Recuperación (%)
1	110	0,17	1,4	2,3	0,1	-	96
2	200	0,17	3,3	2,0	<0,1	1,5	96

\* Los niveles de impurezas fueron: 38,5 ppm de ProA y 51.943 ppm de PCH (Pasada 1), 8,8 ppm de ProA y 25.398 ppm de PCH (Pasada 2).

*Experimento 1.3: pasadas por columna en condiciones de reparto débil (prueba de producto alta)*

Cromatografía de intercambio de aniones de TMAE (HiCap M)

Se realizaron varias pasadas de proteína A de MabSelect esencialmente tal como se ha descrito en el Experimento 1.2 para generar el material de carga para estas pasadas. El agrupamiento de anticuerpos parcialmente purificados de la etapa de proteína A se purificó adicionalmente en la columna de TMAE. La carga en la columna de TMAE era de Tris 50 mM, a pH 8,2. El diámetro de columna fue de 0,5 cm y la altura de lecho fue de 10 cm de altura de lecho (volumen: 2,0 ml). La columna se sometió a prueba en una carga de 500 mg/ml de resina, con una concentración de carga de 27,7 mg/ml.

La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 50 mM, NaCl 2 M, a pH 7,5, seguido de otra etapa de equilibrio que comprendía una solución de Tris 50 mM, a pH 8,2. A continuación, se cargó la columna en 500 mg de producto/ml de resina con el pico de proteína A neutralizada de la etapa anterior y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado.

Estas condiciones de carga están en la región de reparto débil. Se usaron estudios de unión de lotes para medir el coeficiente de reparto (Kp) y la unión de producto a concentraciones de proteína altas. A pH 8,2 y un contenido de cloruro aproximado de 12 mM, el coeficiente de reparto, Kp, se estima que es de 1,9 (a partir de la interpolación del conjunto de datos del cribado CAP).

Los niveles de PCH y proteína A se midieron en tres fracciones durante la fase de carga, lo que representó pruebas de carga de aproximadamente 250, 375 y 500 mg/ml de resina. Los resultados del Experimento 1.3 se presentan en la Tabla 1.3.1. Estos resultados demuestran que se pueden lograr pruebas de producto altas en el modo de reparto débil, sin avance de impurezas. Se logró una excelente reducción tanto de PCH como de proteína A, junto con una reducción del 50 % del contenido de PMA. En comparación con los resultados de la operación en el modo de flujo continuo en la Tabla 1.2.1, la retirada de impurezas fue mucho mejor en el modo de reparto débil.

**Tabla 1.3.1: retirada de PCH, proteína A y PMA en una prueba de carga de TMAE de 500 mg/ml**

	Fracción inicial (250 mg/ml)	Fracción intermedia (375 mg/ml)	Fracción final (500 mg/ml)	Agrupamiento de productos finales (ppm)
ppm de PCH residual (ng/mg de producto)	< 7,6	< 7,6	< 7,6	< 7,6
Valor log de retirada (VLR) de PCH	> 3,5	> 3,5	> 3,5	> 3,5
ppm de proteína A residual (ng/mg de producto)	0,3	No determinado	0,1	0,6
Valor log de retirada (VLR) de ProA	2,9	No determinado	2,3	2,5
PMA	No determinado	No determinado	No determinado	Retirada de 2 veces
* Las impurezas en la carga fueron 25.398 ppm de PCH, 99,5 ppm de proteína A y el 2,3 % de PMA.				

*Experimento 1.4: pasadas por columna en condiciones de reparto débil (estudios sólidos)*

A fin de confirmar adicionalmente el rendimiento de la columna de TMAE en la región de reparto débil, se diseñaron varias pasadas que variaban la concentración de NaCl y pH en la carga para someter a ensayo la solidez del procedimiento. Todas las pasadas se realizaron en una prueba de carga de 250 mg/ml de resina. Se realizaron varias pasadas de proteína A de MabSelect esencialmente tal como se ha descrito en el Experimento 1.2 para generar el material de carga para estas pasadas. El único factor que varió en aquellas pasadas fue la concentración de cloruro de sodio en la elución de proteína A, que varió para coincidir con la concentración de NaCl en la carga de TMAE para un experimento particular. Las columnas se equilibraron con tampones de Equilibrio 2 y se lavaron con tampones de lavado que tenían aproximadamente el mismo pH y contenido de cloruro de sodio que la carga.

Estas condiciones de carga están en la región de reparto débil. Se usaron estudios de unión de lotes para medir el coeficiente de reparto (Kp). Las pasadas se clasifican según los coeficientes de reparto enumerados en la Tabla 1.4.1. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV e intervalos de 7,8 a 25,3 mg/ml. Los resultados de proteína A, PCH y PMA de estos experimentos también se presentan en la Tabla 1.4.1. Se halló que la retirada de la totalidad de las impurezas era sólida en los intervalos de operación que abarcan 13,5-38,8 mM de cloruro total y pH 7,8 - 8,4.

**Tabla 1.4.1: estudios sólidos de procedimiento sobre la retirada de PCH, proteína A y PMA en el modo de reparto débil**

Concentración de NaCl (mM)	Kp	Producto unido (mg/ml)	pH	PCH en carga (ppm)	Proteína A en carga (ppm)	PCH (VLR)	Proteína A (VLR)	PMA (veces)	Recuperación (%)
38,8	0,26	9,4	7,8	26.391	493,5	3,7	1,8	2,0	92
13,5	0,41	7,9	7,8	12.821	69,2	3,3	>1,9	1,8	87
27,4	0,50	8	8,0	23.465	252	3,6	2,2	3,2	91
18,5	0,73	7,8	8,0	21.626	308	3,7	>3,2	2,9	90
23,5	0,80	9,5	8,1	18.004	343	3,2	>3,2	3,5	94
27,7	0,86	9,5	8,2	24.821	280	3,6	>3,2	2,6	99
18,5	1,48	10	8,2	17.669	252	3,7	>3,1	3,9	95
22,0	5,35	25,3	8,4	29.293	533	3,6	>2,9	2,3	90

\* Los niveles de impurezas fueron: 38,5 ppm de ProA y 51.943 ppm de PCH (Pasada 1), 8,8 ppm de ProA y 25.398 ppm de PCH (Pasada 2).  
+ incluye el aporte de iones Cl<sup>-</sup> de NaCl, tampones y valorantes

**Resumen**

A partir de este estudio, se puede observar que la retirada de proteína A (VLR) varía en gran medida con el Kp, mientras que el VLR de PCH es excelente en todos los valores de Kp a o por encima de 0,26, pero muy reducido a Kp = 0,17 (en condiciones de flujo continuo). La retirada de proteínas de células hospedadoras es más de un log inferior en las condiciones de flujo continuo, en comparación con las condiciones de reparto débil, incluso en una prueba de carga reducida. El producto unido varía entre 7,8 y 25 mg/ml en estas condiciones de reparto débil en esta combinación de resina y anticuerpo monoclonal. El coeficiente de reparto parece que es óptimo entre 0,41 < Kp < 5,4. Este no parece que sea óptimo en un Kp=0,17 y un producto unido de 1,4 -3,3 mg/ml, las condiciones del Experimento 1.2.

**Serie 2: intercambio de aniones usando TMAE-HiCapM y Mab-IMA****Experimento 2.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de RD y FC**

Se realizó un cribado de alta productividad (CAP) para identificar las condiciones de reparto débil y de flujo continuo de Mab-IMA con un medio de TMAE-HiCap (M). Este cribado varió la concentración de cloruro de sodio y el pH para determinar su efecto sobre el grado de unión de MAB-IMA y las impurezas relacionadas con el procedimiento (proteína A y PCH) al medio de TMAE. Se añadieron 100 µl de medio de TMAE-HiCap a cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo se equilibró en soluciones constituidas por tampón 25 mM a no más de 1 unidad de pH de diferencia del pKa de tampón (Tabla 2.1.1) y el nivel adecuado de cloruro de sodio (Tabla 2.1.2). El pH varió de 7,00 a 8,75 y la concentración de cloruro de sodio varió de 1 mM a 190 mM.

Todos los tampones se valoraron hasta el pH diana usando HCl 12 M. Como resultado de que las diferentes especies de tampón requerían diferentes niveles de valorante, la concentración de cloruro varió de pocillo a pocillo dependiendo de qué tampón se usaba para ese pocillo. La cantidad de Cl necesaria para valorar el tampón hasta el pH diana se calculó usando la ecuación de Henderson-Hasselbach y se añadió al Cl aportado total tanto del NaCl como de la cantidad en el material de carga. El nivel de Cl calculado para cada pocillo en el experimento se enumera en la Tabla 2.1.3.

**Tabla 2.1.1: tipo de tampón y pH diana en cada pocillo**

	Todas las columnas
<b>A</b>	Etanolamina (pH = 8,75)
<b>B</b>	Tris (pH = 8,5)
<b>C</b>	Tris (pH = 8,25)
<b>D</b>	Tris (pH = 8,0)
<b>E</b>	Tris (pH = 7,75)
<b>F</b>	Tris (pH = 7,5)
<b>G</b>	Bis-Tris (pH = 7,25)
<b>H</b>	Bis-Tris (pH = 7,0)

**Tabla 2.1.2: niveles de NaCl en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Todas las filas</b>	1	5	10	15	25	35	50	75	100	125	150	190

**Tabla 2.1.3: niveles de Cl en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	22	26	31	36	46	56	71	96	121	146	171	211
<b>B</b>	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
<b>C</b>	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200
<b>D</b>	15	19	24	29	39	49	64	89	114	139	164	204
<b>E</b>	18	22	27	32	42	52	67	92	117	142	167	207
<b>F</b>	21	25	30	35	45	55	70	95	120	145	170	210
<b>G</b>	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
<b>H</b>	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200

En la primera fase del experimento de CAP, cada pocillo se equilibró en las condiciones de NaCl y pH, tal como se describe en las Tablas 2.1.1 y 2.1.2, en una relación en volumen de fase de 3:1 (300 µl de solución: 100 µl de resina). La placa se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que se consiguiera el equilibrio. A continuación, se retiró la solución mediante la centrifugación de la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

En la segunda fase, la resina en cada pocillo se sometió a prueba con una solución concentrada de MAb-IMA en 3 mg/ml de resina con una relación en volumen de 3:1 (300 µl de solución: 100 µl de resina) a la concentración de NaCl y el pH adecuados. Una solución de 30 mg/ml de Mab-IMA en Mes 1 mM, NaCl 15 mM, a pH 6,5, con 300 ppm de proteína A se usó como solución madre. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que la resina y la solución se equilibraran. El sobrenadante se retiró de la placa de filtro mediante centrifugación y se recogió en una placa de recogida. La concentración de proteína en el sobrenadante en cada pocillo se determinó mediante absorbancia a A280 nm. Cualquier disminución en los niveles de proteína A y/o PCH indica una condición propicia para la purificación.

En la tercera fase, la resina se lavó mediante la adición de soluciones de las condiciones especificadas de NaCl y pH enumeradas en la Tabla 2.1.2. El sobrenadante se retiró después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta fase, se añadió NaCl 2 M para retirar la proteína restante que se unió a la resina. Los coeficientes de reparto se calcularon en cada pocillo usando la masa eluida de las Fases 3 y 4 y la concentración de producto de la Fase 2 y se muestran en la Tabla 2.1.4. En la Figura 9, se muestra un diagrama de contorno del log del coeficiente de reparto en función del pH y el cloruro.

**Tabla 2.1.4: coeficientes de reparto (Kp) para el cribado CAP de 96 pocillos de MAB-IMA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	34,5	20,2	11,4	7,2	3,5	1,8	0,8	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2
<b>B</b>	97,1	42,4	19,3	9,9	4,3	2,2	1,0	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
<b>C</b>	14,8	9,4	5,8	4,2	2,0	1,1	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
<b>D</b>	1,8	1,6	1,3	1,0	0,7	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>E</b>	0,7	0,7	0,7	0,6	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>F</b>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>G</b>	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>H</b>	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tal como se muestra en la Tabla 2.1.4, el valor de Kp se puede usar para describir regiones en las que MAB-IMA se une al medio de TMAE con diferentes resistencias. Estas regiones se visualizan más claramente en la Figura 9. La resistencia de la unión de MAB-IMA al medio de TMAE se puede manipular mediante la variación de las condiciones de concentración de cloruro y pH en las zonas de flujo continuo ( $K_p \leq 0,1$ ), reparto débil ( $0,1 < K_p < 20$ ) y unión ( $K_p \geq 20$ ).

El sobrenadante de la fase de carga de varios pocillos de cada zona se muestreó y se sometió a examen de proteína A. La carga tenía 300 ppm de proteína A. Los resultados del análisis de estas muestras se resumen en la Tabla 2.1.5. Existe una región de pH y conductividad en la que la etapa de cromatografía de TMAE proporciona una retirada muy significativa de la proteína A con una pérdida de proteína limitada en la resina. Se halló que esta región estaba estrechamente correlacionada con el valor de coeficiente de reparto, Kp, y no con ninguna concentración de cloruro o pH específicos.

**Tabla 2.1.5: niveles residuales de proteína A y datos de unión de MAB-IMA del cribado CAP**

pH	Cl-(mM)	Kp (previsto)	Proteína A (ppm)
8,5	12	42,4	<28 -BLOQ
8,5	32	4,3	<7 - BLOQ
8,25	35	2,0	<5 - BLOQ
8,25	45	1,13	<4 - BLOQ
8,0	39	0,7	<4 - BLOQ
8,25	60	0,5	<4 - BLOQ
7,75	42	0,4	<4 - BLOQ
7,5	45	0,3	35
8,0	64	0,3	63
8,25	110	0,3	190
7,25	32	0,2	90
8,0	89	0,2	177
8,75	121	0,3	217
7,75	92	0,2	187
7,5	120	0,2	219
7,25	107	0,2	224

*Los valores de Kp previstos se derivan de un ajuste de superficie de respuesta al cribado CAP y la previsión posterior del Kp a base de este modelo de regresión.*

**Experimento 2.2: pasadas por columna en condiciones de FC usando TMAE-HiCapM y Mab-IMA**

El siguiente experimento se realizó en el modo de flujo continuo (FC), en el que Mab-IMA interactúa únicamente muy débilmente con la columna. Se realizaron cuatro pasadas, con pruebas de producto de entre 109 y 275 mg/ml de resina.

**Cromatografía de intercambio de aniones de TMAE (HiCap M)**

En todas las etapas de cromatografía de intercambio de aniones de TMAE (HiCapM) descritas en la serie de Experimento 2, se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

- 10 Caudal operativo: 150 - 300 cm/h  
 Equilibrio 1: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 u 8,0 (5 volúmenes de columna)  
 Equilibrio 2: NaCl 75 mM, Tris 50 mM, a pH 7,5 (las series 3 y 4 contenían glicina 50 mM)  
 Lavado posterior a la carga: NaCl 75 mM, Tris 50 mM, a pH 7,5 (las series 3 y 4 contenían glicina 50 mM)  
 Tampón de extracción: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 u 8,0 (5 volúmenes de columna)
- 15 Se realizaron varias pasadas de proteína A de MabSelect esencialmente tal como se ha descrito en el Experimento 1.2 para generar el material de carga para estas pasadas. Los agrupamientos de anticuerpos parcialmente purificados de la etapa de proteína A descrita anteriormente se purificaron adicionalmente en la etapa de intercambio de aniones en un modo de flujo continuo (FC). Los diámetros de columna variaron de 1,0 a 3,2 cm y las alturas de columna fueron de 7,2 a 8,5 cm.
- 20 Las columnas se equilibraron con 5 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 50 mM, NaCl 2 M, a pH 7,5, seguido de otra etapa de equilibrio que comprendía una solución de Tris 50 mM, a pH 7,5. A continuación, las columnas se cargaron en entre 109 mg/ml y 275 mg/ml con el pico de proteína A parcialmente purificada y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado.
- 25 Estas condiciones de carga estaban en la región de flujo continuo (FC). El cribado de alta productividad descrito en el Experimento 2.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto (Kp) en estas condiciones de concentración de cloruro y pH. Las pasadas se clasifican según los coeficientes de reparto enumerados en la Tabla 2.2.1. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación de la cantidad de producto unido típicamente subestima la cantidad total de producto unido debido a la elución isocrática del producto en el lavado. Los resultados de retirada de proteína A, PCH, PMA y PMB de estos experimentos también se presentan en la Tabla 2.2.1. Existe una retirada relativamente deficiente y variable de PCH y ninguna retirada de proteína A y variantes de producto (especies de PMA y PMB).
- 30

Tabla 2.2.1: retirada de PCH, proteína A y PMA y PMB en el modo de FC

Kp	Producto unido (mg/ml)	pH	Cl- (mM)	Prueba de carga (mg/ml)	ProA en carga (ppm)	PCH en carga (ppm)	PCH (VLR)	ProA (VLR)	PMA (veces)	PMB (veces)	Recuperación (%)
0,1	0,5	6,5	83	150	ND	4.166	1,8	ND	1	1,1	>95 %
0,2	0,8	7,0	83	275	25	1.575	0,6	<0,1	1	1	>95 %
0,2	ND	7,3	83	109	24	3.117	2,4	<0,1	1	1	>95 %
0,3	0,3	7,5	83	167	ND	4.572	1,8	ND	1	1	>95 %

ND = no determinado

*Experimento 2.3: pasadas por columna en condiciones de reparto débil de Mab-IMA*

Los siguientes experimentos de columna se realizaron en el modo de reparto débil en las condiciones identificadas mediante el cribado CAP (Experimento 2.1). Se realizaron siete pasadas por la columna de TMAE de agrupamientos de proteína A parcialmente purificada.

5 Cromatografía de TMAE HiCap (M)

El anticuerpo parcialmente purificado de una pasada de etapa de proteína A esencialmente igual que la descrita anteriormente se purificó adicionalmente en la etapa de TMAE en condiciones de reparto débil (RD) de pH y contenido de cloruro, tal como se describe a continuación. Los diámetros de columna variaron de 0,5 a 3,2 cm y las alturas de columna fueron de 9,4-9,5 cm.

10 Las columnas se equilibraron con 5 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 50 mM, NaCl 2 M, a pH 7,5 u 8,0, seguido de otra etapa de equilibrio que comprendía una solución de glicina 50 mM, Tris 50 mM, a pH 7,5 u 8,0. A continuación, las columnas se cargaron en entre 124 mg/ml y 303 mg/ml con el pico de proteína A parcialmente purificada y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 2.3.1.

15 Estas condiciones de carga están en la región de reparto débil (RD). El cribado de alta productividad descrito en el Experimento 2.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto ( $K_p$ ). Las pasadas se clasifican según los coeficientes de reparto enumerados en la Tabla 2.3.1. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación de la cantidad de producto unido típicamente subestima la cantidad total de producto unido debido a la elución isocrática del producto en el lavado. Los resultados de proteína A, PCH, PMA y PMB de estos experimentos también se presentan en la Tabla 2.2.1. Existe una retirada constante y alta de PCH, una excelente retirada de proteína A y una valiosa reducción de variantes de producto (especies de PMA y PMB).

20 Una comparación de los datos presentados en las Tablas 2.2.1 y 2.3.1 confirma que la retirada de PCH, proteína A, PMA y PMB en las condiciones de un modo de flujo continuo (valores de  $K_p$  de  $\leq 0,3$ ) es mucho menor que lo que se puede lograr en las condiciones de reparto débil (valores de  $K_p > 0,3$ ), incluso cuando la prueba de carga excede los 300 mg/ml.

25

Tabla 2.3.1: retirada de PCH, proteína A, PMA y PMB en condiciones de reparto débil. ND = no determinado

Kp	Producto unido (mg/ml)	pH	Cl- (mM)	Prueba de carga (mg/ml)	ProA en carga (ppm)	PCH en carga (ppm)	PCH (VLR)	ProA (VLR)	PMA (veces)	PMB (veces)	Recuperación (%)
0,6	ND	7,5	14	303	72	754	1,9	1,6	1,3	1,5	>95 %
0,7	ND	8,0	55	303	72	754	2,0	1,5	1,0	1,2	>95 %
0,7	4	7,9	45	307	213	1.852	2,6	2,4	ND	ND	>95 %
1,0	5	8,1	45	302	222	1.852	2,6	3,0	ND	ND	>95 %
1,2	30	8,0	35	124	52	3.320	2,8	>2,1	1,4	1,1	89 %
1,7	ND	8,0	26	303	72	754	2,3	>2,6	1,1	1,8	>95 %
1,7	9	8,1	31	310	ND	ND	ND	ND	ND	ND	90 %
1,8	25	7,8	14	169	23	2.462	3,0	>1,8	1,9	2,1	86 %
5,2	9	8,0	17	303	72	754	2,0	>2,6	1,7	1,6	>95 %
8,9	59	8,2	12	284	ND	ND	ND	ND	1,5	2,1	75 %

**Experimentos 2.4: rendimiento de pasadas por columna de reparto débil a escala de fabricación clínica y piloto**

La etapa de procedimiento de TMAE para la purificación de Mab-IMA que se opera en la zona de reparto débil se amplió a la planta piloto y fabricación clínica. El cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó, en primer lugar, usando una columna MabSelect de 3 l o 5 l en la planta piloto y una columna MabSelect de 28 l durante la fabricación clínica. La columna MabSelect se operó esencialmente tal como se describe en el Experimento 1.2. Los agrupamientos de picos de proteína A neutralizados de estas pasadas se purificaron adicionalmente en una columna de TMAE de 1,5 l en la planta piloto y una columna de TMAE de 7 l en la instalación de fabricación clínica.

Los resultados de tres pasadas de planta piloto y nueve pasadas de fabricación clínica se resumen en las Tablas 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente. El rendimiento de las etapas fue constante en las pasadas, con una excelente reducción de PCH, proteína A y una buena retirada de especies de PMA y PMB relacionadas con el producto. La recuperación del producto fue del >87 % en todas las pasadas. Se obtuvo una estimación del producto unido a la resina durante las pasadas de planta piloto a partir del producto en la extracción de columna, que varió entre 6 y 14 mg/ml de resina.

**Tabla 2.4.1: rendimiento de las pasadas a escala piloto en condiciones de reparto débil**

	Kp	Producto unido (mg/ml)	pH	Cl- (mM)	Prueba de carga (mg/ml)	PCH (VLR)	ProA (VLR)	PMA (veces)	PMB (veces)	Recuperación (%)
Pasada 1	1,7	14	8,1	31	253	3,4	>2,6	2,0	2,0	90
Pasada 2	1,7	13	8,1	31	184	>3,6	>2,6	1,0	3,0	88
Pasada 3	1,7	6	8,1	31	150	ND	>2,8	1,3	1,2	88

ND = no determinado

**Tabla 2.4.2: rendimiento de las pasadas a escala de fabricación en condiciones de reparto débil**

	Kp	Prueba de carga (mg/ml)	Cl- (mM)	pH	PCH* (VLR)	ProA* (VLR)	PMA (veces)	PMB (veces)	Recuperación (%)
Pasada 1	3,2	90	30	8,1	>2,2	≥ 0,8	2,5	3,0	90
Pasada 2	2,5	180	29	8,0	>2,2	>0,0	1,9	1,5	93
Pasada 3	2,6	133	28	8,0	>2,3	≥ 1,0	2,5	1,8	95
Pasada 4	2,6	174	29	8,0	>2,2	≥ 1,0	2,5	1,2	94
Pasada 5	2,2	136	31	8,0	>2,0	≥0,9	2,3	1,7	102
Pasada 6	3,8	146	27	8,1	> 2,2	≥0,8	2,5	1,8	91
Pasada 7	2,0	118	28	7,9	>2,2	≥ 1,0	1,6	1,6	96

\* Los niveles de PCH y proteína A en el agrupamiento de picos de TMAE estaban por debajo del límite de cuantificación.

**15 Resumen**

El CAP identificó las condiciones de la operación de RD y FC. El modo de FC proporcionó únicamente una reducción moderada de las especies de PCH y PMB y ninguna reducción de los restos de proteína A o las especies de PMA. La operación en el modo de RD mejora la retirada de la totalidad de las impurezas sin sacrificar el rendimiento del producto. La etapa de procedimiento se amplió en la planta piloto y se operó de manera constante durante tres pasadas, con VLR muy altos de PCH y proteína A y buenas reducciones de las especies de PMA y PMB.

**Serie 3: intercambio de aniones usando TMAE-HiCapM y Mab-AAB****Experimento 3.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de RD y FC**

El experimento 3.1 se realizó usando los procedimientos descritos en el Experimento 1.1.

**25 Experimento 3.2: pasadas de capacidad por columna en condiciones que corresponden a coeficientes de reparto variables**

Se realizaron cinco experimentos de cromatografía en condiciones que correspondían a un intervalo de coeficientes de reparto identificados mediante el cribado CAP (Experimento 3.1). Las columnas de TMAE se cargaron hasta una prueba de carga muy alta (>1.000 g/l) para resaltar específicamente el rendimiento superior de la etapa de AEX en

condiciones de reparto débil.

Las siguientes condiciones se usaron para las pasadas de AEX realizadas en la Serie 3 (las excepciones se indican en las descripciones experimentales individuales).

- 5 Caudal operativo: 150 - 300 cm/h
- Equilibrio 1: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
- Equilibrio 2: tal como se especifica, aproximadamente equivalente al contenido de cloruro y pH de carga
- Lavado posterior a la carga: tal como se especifica, aproximadamente equivalente al contenido de cloruro y pH de carga
- Tampón de extracción: Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, a pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

10 La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del tampón de equilibrio 1, seguido de 5 volúmenes de columna de la etapa de equilibrio 2. A continuación, la columna se cargó en entre 940 y 2.144 mg de producto/ml de resina con el agrupamiento de picos de proteína A (véase la Serie 1, Experimento 1.1) ajustado al tampón de equilibrio 2 adecuado.

15 Se recogieron las fracciones de efluente de columna y, posteriormente, se analizaron los niveles de PCH y proteína A residual. Las condiciones de carga usadas en estos experimentos corresponden a coeficientes de reparto progresivamente crecientes que abarcan las regiones de reparto débil (RD) y de flujo continuo. El cribado de alta productividad descrito en el Experimento 3.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto (Kp). Los valores de producto unido en este ejemplo se calcularon basándose en el producto eluido en la extracción. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 3.2.1 y en las Figuras 10A y 10B.

20 **Tabla 3.2.1: resumen de resultados de experimentos de prueba de carga muy alta en el modo de RD**

	Coeficiente de reparto Kp	Condiciones de operación	Prueba de carga mg/ml	Producto unido mg/ml*	Recuperación*
Pasada 1	0,1	Flujo continuo	1.754	0	100
Pasada 2	0,23	Reparto débil	940	14,2	98,5
Pasada 3	0,8	Reparto débil	940	12,0	98,7
Pasada 4	0,8	Reparto débil	2.144	23,0	98,9
Pasada 5	2,73	Reparto débil	960	12,6	98,7
Pasada 6	7	Reparto débil	1.130	71,7	93,7

\* A base de cálculos de equilibrio de masa.

25 El valor de producto unido en la pasada correspondiente a un Kp de 0,1 fue de casi cero, tal como se espera en una operación típica de flujo continuo. Los valores de producto unido en los experimentos realizados en la región de reparto débil fueron de > 12,0 mg/ml en todos los casos. De hecho, el valor de producto unido en la pasada correspondiente al Kp de 7 fue tan alto como de 71 mg/ml. La recuperación de producto en las fracciones combinadas de lavado y eluido de carga en todos los casos fue, sin embargo, del > 93 %.

30 La retirada de PCH y proteína A, en función de la prueba de carga, se presenta en las Figuras 10A y 10B. Tal como se ha analizado anteriormente, la retirada de PCH aumenta significativamente a medida que las condiciones pasan del flujo continuo al reparto débil. La operación en condiciones de flujo continuo proporciona aproximadamente 1,5 log de eliminación de PCH, mientras que los valores de log de retirada de PCH fueron tan altos como de 3,8 log en las pruebas de carga de < 450 mg/ml de resina, cuando se operó a un Kp de 7 en la región de reparto débil. A un Kp de 0,8 en la región de reparto débil, se obtuvieron 2,8 log de eliminación de PCH en pruebas de carga de hasta 1.000 mg/ml de la resina y se obtuvieron >3 log de eliminación de PCH en una prueba de carga de hasta 800 mg/ml de resina a un Kp de 2,7 en la región de reparto débil.

35 Tal como en el caso de PCH, la retirada de proteína A aumenta significativamente a medida que se pasa de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de reparto débil. Los resultados presentados en las Figuras 10A y 10B también resaltan el hecho de que el aumento del Kp de la operación de la región de flujo continuo a reparto débil aumenta los valores de log de eliminación tanto de PCH como de proteína A obtenidos antes del avance del contaminante, así como la prueba de carga correspondiente al punto de avance. Un aumento adicional del Kp continúa aumentando el VLR de PCH y proteína A antes del avance del contaminante. Sin embargo, el punto de avance se produce en pruebas de carga relativamente más bajas, ya que el producto unido ahora compite con los contaminantes por los sitios de unión. No obstante, la capacidad de columna en las pasadas presentadas en el presente documento fue muy alta incluso en la pasada de Kp alto.

*Resumen*

En este ejemplo, se mostró que la retirada de proteína A y PCH se puede mejorar significativamente mediante la operación de la etapa de AEX en condiciones de reparto débil y en pruebas de carga que exceden los 1.000 mg/ml de resina. Este ejemplo destaca una diferencia fundamental entre la cromatografía de reparto débil y las operaciones convencionales en condiciones de unión. Las condiciones de reparto débil impulsan los límites de la unión de producto únicamente hasta un punto en el que la eliminación de contaminantes mejora significativamente, al tiempo que la recuperación de producto y las pruebas de carga siguen siendo altas. Los valores de  $K_p$  correspondientes a las condiciones de unión son de  $> 20$  en AEX; en estas condiciones, los efectos competitivos entre el producto y el contaminante son muy fuertes, lo que conduce a una capacidad reducida en comparación con la cromatografía de reparto débil.

**Serie 4: interacción hidrófoba usando Fenil Toyopearl y Mab-AAB***Experimento 4.1: estudios de unión de lotes para establecer las condiciones de RD y FC*

Se realizaron estudios de unión de lotes para identificar las condiciones de reparto débil y flujo continuo de Mab-AAB con el medio de Fenil Toyopearl a través de Tosoh Biosciences. La sal que modula la resistencia de la interacción del producto con la resina es  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , que varió de 0,20 a 0,90 M. Las soluciones se tamponaron para controlar a un pH 7,5. Se usaron placas de filtro de 45  $\mu\text{m}$  para incubar la resina con líquido y decantar el sobrenadante a través de centrifugación. Ocho tampones de Tris/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se fabricaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a diferentes concentraciones (de 0,2 M a 0,9 M). Mab-AAB, que se purificó parcialmente mediante cromatografía de proteína A, se diluyó en solución de Tris/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  hasta una concentración final de 0,87 mg/ml. Se equilibraron 50  $\mu\text{l}$  de resina con 300  $\mu\text{l}$  de tampón y, a continuación, se decantó el sobrenadante en cada una de las condiciones de Tris/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; este equilibrio se repitió tres veces. Después del equilibrio, la resina decantada se mezcló con el producto a la misma concentración de sal y pH y se incubó durante 30 minutos con agitación suave. La prueba de carga fue de 5,2 mg de producto/ml de resina en todas las condiciones. A continuación, se apiló una placa UV en el fondo de la placa de filtro para recoger el sobrenadante tras la centrifugación. Posteriormente, se aplicaron 300  $\mu\text{l}$  de tampón de Tris 50 mM a pH 7,5 a la resina para la extracción del producto unido. Después de una incubación de 20 minutos, la extracción se recogió en una placa UV separada a través de centrifugación. La concentración del producto en cada fracción se midió mediante absorbancia UV y el coeficiente de extinción de este MAb. Los cálculos se ajustaron para un volumen de arrastre de fase a fase de 29  $\mu\text{l}$ , que se determinó a través de un conjunto separado de experimentos. El experimento se repitió cuatro veces en cada condición de sal y se indica el coeficiente de reparto promedio.

La Tabla 4.2.1 resume los coeficientes de reparto de este experimento. Las concentraciones más altas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  provocó una fuerte unión de producto, mientras que las concentraciones de sal en el intervalo de 0,40 - 0,55 M representan condiciones de reparto débil.

*Experimento 4.2: pasadas por columna en condiciones de reparto débil, flujo continuo y unión (estudios de prueba de producto alta)*

Las pasadas por columna se realizaron en condiciones de flujo continuo, reparto débil y unión fuerte. En todas las pasadas de cromatografía de interacción hidrófoba con Fenil Toyopearl descritas en los experimentos de Serie 4 se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

Dimensión de columna: diámetro de 0,5 cm, altura de lecho de 9,5 - 10,5 cm  
Equilibrio: Tris 50 mM, a pH 7,5, con  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  aproximadamente equivalente a la carga  
Carga:  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ , tal como se especifica a continuación  
Lavado:  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  igual a la carga (las excepciones se indican a continuación)  
Extracción: Tris 50 mM, a pH 7,5

Se usaron dos cargas diferentes: i) agrupamientos de anticuerpos parcialmente purificados de una pasada de etapa de proteína A esencialmente igual que aquellas anteriormente descritas o ii) agrupamientos de productos de TMAE Q Sepharose FF más puros de la operación en modo de FC.

*Experimento 4.2.1: pasadas por columna usando un agrupamiento de picos de proteína A como carga*

Los experimentos analizados en el presente documento se realizaron para resaltar el rendimiento superior de CIH en condiciones de reparto débil. Las pasadas por columna se realizaron en concentraciones variables de sal para abarcar un intervalo de coeficientes de reparto que corresponden a las condiciones de flujo continuo, reparto débil y unión fuerte. El cribado de unión de lotes descrito en el Experimento 4.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto ( $K_p$ ). Las columnas se equilibraron con 5 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 50 mM, a pH 7,5 y adecuada  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  a la concentración especificada. El pico de proteína A se concentró, en primer lugar, 10 veces y, posteriormente, se diluyó hasta 14,77 mg/ml en la concentración de sal adecuada. Los niveles de proteína de célula hospedadora (PCH) y de proteína A residual en el material de carga fueron de 30.911 ppm y 17,1 ppm, respectivamente. Todas las pasadas por columna se realizaron en una prueba de carga de 100 mg/ml de resina. El producto se recogió en el efluente de columna durante la fracción del ciclo de carga. Después del flujo continuo de producto, se aplicaron a la columna diez volúmenes de columna de tampón de lavado a la misma concentración de sal que la carga, seguido de cinco volúmenes de columna de un tampón de extracción que contenía Tris 50 mM, a pH 7,5. El contenido de PCH y proteína A en las muestras de lavado y eluido de carga se analizaron posteriormente

mediante EISLE. El nivel combinado de impurezas en las fracciones de lavado y eluido de carga se indica en la Tabla 4.2.1.

- 5 Las pasadas se clasifican según los coeficientes de reparto. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación del producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado.

**Tabla 4.2.1: retirada de impurezas en condiciones de flujo continuo, reparto débil y unión fuerte**

	Conc. de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Coefficiente de reparto Kp	Ventana de operación	Producto unido (mg/ml)	Recuperación de producto (%)	Retirada de proteína A (veces)	Retirada de PCH (log)
Pasada 1	0,10 M	<0,1	Flujo continuo	0,6	94	0,9	0,3
Pasada 2	0,20 M	<0,1	Flujo continuo	1,3	93	0,8	0,4
Pasada 3	0,40 M	0,9	Reparto débil	2,8	94	1,7	1,0
Pasada 4	0,45 M	2,0	Reparto débil	3,0	93	1,5	0,9
Pasada 5	0,50 M	4,3	Reparto débil	3,8	92	2,5	N/A
Pasada 6	0,55 M	9,9	Reparto débil	5,0	93	3,4	1,1
Pasada 7	0,80 M	>100	Unión fuerte	25	12	2,2	0,7
Pasada 8	0,90 M	>100	Unión fuerte	34	67	1,1	0,4

(El coeficiente de reparto Kp representa la relación en volumen de fase de 6 a partir de 50 microlitros de resina y 300 microlitros de solución).

- 10 Tal como resulta evidente a partir de los datos presentados en la Tabla 4.2.1, el rendimiento de la etapa de CIH mejora significativamente con respecto a la reducción de contaminantes a medida que se pasa de condiciones de flujo continuo a condiciones de reparto débil, al tiempo que la recuperación de producto es comparable. Un aumento adicional en la concentración de sal de operación conduce a coeficientes de reparto que corresponden a las condiciones de unión fuerte. Una vez más, resulta evidente a partir de los datos presentados en la Tabla 4.2.1 que el rendimiento de la etapa de CIH se deteriora con respecto a la reducción de contaminantes, así como la recuperación de producto, a medida que se pasa de condiciones de reparto débil a unión fuerte. La ventana de operación óptima para esta separación corresponde, por lo tanto, a la de la cromatografía de reparto débil. En condiciones de reparto débil, la etapa de CIH proporciona una reducción de PCH de 1 log y una reducción de 3,4 veces de proteína A. Los niveles de producto unido en las condiciones de reparto débil, en este ejemplo, estaban entre 2,8 y 5 mg/ml de la resina.
- 15

*Experimento 4.2.2: pasadas por columna usando agrupamiento de picos de Q-Sepharose como carga*

- 20 El agrupamiento de picos de Q Sepharose FF se usó en estos conjuntos de experimentos para resaltar el hecho de que el rendimiento de la etapa de CIH en las condiciones óptimas de cromatografía de reparto débil se puede mejorar adicionalmente con una carga de alimentación más limpia. El material de carga, en este caso, contenía 2.880 ppm de PCH y se generó mediante la purificación del agrupamiento de picos de proteína A en una columna de Q-Sepharose FF. Dos experimentos, uno en condiciones de reparto débil y el otro en condiciones típicas de flujo continuo, se realizaron para comparar el rendimiento de columna con respecto a la retirada de impurezas. El pico de Q-Sepharose se diluyó hasta 3,27 mg/ml a 550 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se cargó en la columna hasta una prueba de carga de 100 mg/ml de resina para la operación en condiciones de reparto débil. La columna se lavó posteriormente con 10 VC de un tampón que contenía la misma concentración de sal que la carga y se extrajo con 6 VC de tampón de Tris 50 mM, a pH 7,5. El segundo experimento se realizó en condiciones de flujo continuo. La carga se ajustó hasta 3,03 mg/ml en 200 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se cargó en la columna hasta una prueba de carga de 90 mg/ml de resina. A continuación, la columna se lavó con 6 VC de un tampón que contenía la misma concentración de sal que la carga y, posteriormente, se separó con 6 VC de tampón de Tris 50 mM, a pH 7,5. En ambas pasadas, se recogieron las fracciones de flujo continuo y lavado para el examen de recuperación e impurezas. Los resultados de estas pasadas se indican en la Tabla 4.2.2.
- 25
- 30

**Tabla 4.2.2: comparación de los resultados de reparto débil de CIH con los resultados de flujo continuo**

Pasada	Conc. de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Coefficiente de reparto (Kp)	Modo de operación	Prueba de carga (mg/ml)	Producto unido (mg/ml)	Recuperación de producto	VLR de PCH
1	0,55 M	9,9	Reparto débil	100	3,0	94 %	>2
2	0,20 M	<0,1	Flujo continuo	90	0,1	99 %	<0,5

Los valores de recuperación de producto en condiciones de reparto débil fueron comparables a las operaciones de flujo continuo y también fueron independientes de la carga de alimentación usada en estos experimentos. El rendimiento de las etapas con respecto a la retirada de PCH es significativamente más alto en las condiciones de reparto débil en comparación con la operación de flujo continuo.

El VLR de PCH a través de la etapa de CIH con cualquier carga de alimentación fue comparable en condiciones de flujo continuo (~ 0,4 - 0,5 de VLR). Sin embargo, los valores VLR de PCH de los experimentos realizados en condiciones de reparto débil aumentaron de 1 VLR con el material de carga de proteína A a más de 2 VLR con el material de carga purificado a través de columnas de proteína A y Q Sepharose FF.

## 10 Resumen

Se mostró que otro modo de cromatografía (HIC) opera con éxito en un modo de reparto débil. Se mostró que el rendimiento de la etapa de CIH en condiciones de reparto débil fue superior tanto a las condiciones de flujo continuo, como a las operaciones en condiciones de unión más estrictas, con respecto a la recuperación de producto y la retirada de PCH/proteína A. Se procesó con éxito una alta capacidad de prueba de carga de 100 mg/ml de resina en condiciones de reparto débil, en las que > 3 mg/ml de producto se unió a la resina (a pesar de que la concentración de carga fue de 3,27 mg/ml). Los coeficientes de reparto correspondientes a las condiciones óptimas de reparto débil parece que son ligeramente más altos que aquellos de la cromatografía de intercambio de aniones.

## Serie 5: hidroxiapatita usando hidroxiapatita cerámica tipo I y Mab-MYA

### *Experimento 5.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de RD y FC*

20 Se realizó un cribado de alta productividad (CAP) para identificar las condiciones de reparto débil y de flujo continuo de Mab-MYA con un medio de hidroxiapatita cerámica. Este cribado varió la concentración de cloruro de sodio y fosfato de sodio para determinar su efecto sobre el grado de unión de MAB-MYA al medio de hidroxiapatita.

25 Se añadieron 50 µl de medio de hidroxiapatita cerámica a 30 pocillos de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo se equilibró en soluciones constituidas por las concentraciones adecuadas de cloruro de sodio y fosfato de sodio en un tampón de HEPES 100 mM que contenía arginina 100 mM a pH 7,2. Las concentraciones de las dos sales en la solución se muestran en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2. Cada condición se realizó por duplicado. La prueba de carga de MAB-MYA en cada uno de estos pocillos fue de 5,0 mg/ml de resina.

**Tabla 5.1.1: niveles de cloruro de sodio en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4
<b>A</b>	50	200	50	200
<b>B</b>	750	50	750	50
<b>C</b>	50	380	50	380
<b>D</b>	500	760	500	760
<b>E</b>	50	1140	50	1140
<b>F</b>	200	200	200	200
<b>G</b>	350	200	350	200
<b>H</b>	700		700	

**Tabla 5.1.2: niveles de fosfato de sodio en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4
<b>A</b>	5	20	5	20
<b>B</b>	5	30	5	30
<b>C</b>	8	30	8	30
<b>D</b>	8	30	8	30
<b>E</b>	10	30	10	30
<b>F</b>	10	50	10	50
<b>G</b>	10	100	10	100
<b>H</b>	10		10	

30 En la primera fase del experimento de CAP, cada pocillo se equilibró en las condiciones de cloruro de sodio y fosfato

de sodio descritas en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2, en una relación en volumen de fase de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina). La placa se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que se consiguiera el equilibrio. A continuación, se retiró la solución mediante la centrifugación de la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

5 En la segunda fase, la resina en cada pocillo se sometió a prueba con una solución concentrada de MAb-MYA en la prueba adecuada de carga de proteína con una relación en volumen de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina) a la concentración adecuada de cloruro de sodio y fosfato de sodio. Se usó como solución madre una solución de 7,0 mg/ml de Mab-MYA en NaCl 50 mM, HEPES 100 mM, arginina 100 mM, a pH 7,2. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que la resina y la solución se equilibraran. El sobrenadante se retiró de la placa de filtro mediante centrifugación y se recogió en una placa de recogida. La concentración de proteína en el sobrenadante en cada pocillo se determinó mediante absorbancia a A280 nm.

En la tercera fase, la resina se lavó mediante la adición de soluciones de las condiciones especificadas de cloruro de sodio y fosfato de sodio enumeradas en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2. El sobrenadante se retiró después de agitar durante 20 minutos.

15 En la cuarta fase, un tampón compuesto de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 1 M, a pH 7,2 se añadió para retirar la proteína restante que se unió a la resina.

Los coeficientes de reparto se calcularon en cada pocillo usando la masa eluida de la Fase 4 y la concentración de producto de la Fase 2 y se muestran en la Tabla 5.1.3.

**Tabla 5.1.3: coeficientes de reparto (Kp) para el cribado CAP de 96 pocillos de MAB-MYO**

	1	2	3	4
<b>A</b>	49,3	2,3	50,5	2,4
<b>B</b>	3,5	6,0	4,1	6,0
<b>C</b>	31,6	0,4	34,7	0,3
<b>D</b>	2,9	0,1	3,3	0,1
<b>E</b>	28,1	0,0	28,3	0,0
<b>F</b>	7,2	0,5	7,7	0,4
<b>G</b>	3,5	0,0	3,1	0,0
<b>H</b>	1,1		1,1	

20 Tal como se muestra en la Tabla 5.1.3, el valor de Kp se puede usar para describir regiones en las que MAB-MYA se une al medio de hidroxiapatita con diferentes resistencias. La resistencia de la unión de Mab-MYA al medio de hidroxiapatita cerámica se puede manipular mediante la variación de las condiciones de la concentración de cloruro y fosfato en las zonas de flujo continuo ( $K_p \leq 0,1$ ), reparto débil ( $0,1 < K_p < 20$ ) y unión ( $K_p \geq 20$ ).

*Experimento 5.2: pasadas por columna en condiciones de RD*

25 Los experimentos analizados en el presente documento se realizaron específicamente para resaltar el rendimiento superior de la etapa de cHA en condiciones de reparto débil. Por lo tanto, los experimentos se realizaron en las condiciones correspondientes a un intervalo de coeficientes de reparto identificados mediante el cribado CAP (Experimento 5.1). Se realizaron doce pasadas, con pruebas de carga de producto de 100 mg/ml de resina.

Cromatografía de proteína A de MabSelect

30 El cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó usando una columna MabSelect. Una columna de proteína A de MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM/NaCl 150 mM, a pH 7,5, a un caudal de 300 cm/h. A continuación, se cargó la columna a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. A esto le siguió un lavado de 10 VC en arginina 1 M, Tris 50 mM, a pH 7,5 y un lavado de 5 VC que contenía Tris 10 mM, NaCl 75 mM, lavado a pH 7,5. A continuación, se eluyó la columna usando arginina 100 mM, NaCl 50 mM, a pH 3,0. El agrupamiento de productos se neutralizó hasta pH 7,2 usando HEPES 2 M a pH 8,0.

35 Cromatografía de hidroxiapatita cerámica

Los agrupamientos de anticuerpos parcialmente purificados de la etapa de proteína A se purificaron adicionalmente sobre hidroxiapatita. El diámetro de columna fue de 0,5 cm y la altura de columna fue de 10 cm.

En todas las etapas de cromatografía de hidroxiapatita descritas en la serie de Experimento 5, se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

Caudal operativo: 150 - 240 cm/h

Equilibrio 1 fosfato de sodio 300 mM, NaCl 1,0 M, a pH 6,8 (3 volúmenes de columna)

Equilibrio 2 fosfato de sodio 5 - 30 mM, NaCl 50 - 760 mM, Arg 100 mM, HEPES 100 mM a pH 7,2 (5 volúmenes de columna)

(continuación)

Lavado fosfato de sodio 5 - 30 mM, NaCl 50 - 760 mM, Arg 100 mM, HEPES 100 mM a pH 7,2 (5 - 10 volúmenes de columna)

La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del tampón de equilibrio 1, seguido de otra etapa de equilibrio 2. A continuación, se cargó la columna en 100 mg de producto/ml de resina con el pico de proteína A de la etapa anterior (que se ajustó con el tampón de equilibrio 2 adecuado) y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11.

Estas condiciones de carga estaban en las regiones de flujo continuo, reparto débil (RD) y unión. El cribado de alta productividad descrito en el Experimento 5.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto ( $K_p$ ) y el producto unido (mg/ml de resina) en estas condiciones de concentración de cloruro y fosfato. El producto unido se determinó a partir de los volúmenes de avance de producto de las pasadas por columna. Los resultados de PCH y proteína A de estos experimentos se presentan en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11.

**Tabla 5.2.1: retirada de PCH y proteína A en condiciones de flujo continuo, reparto débil y unión**

	Coeficiente de reparto $K_p$	Modo de operación	Phos	NaCl	Producto unido (mg/ml)	Recuperación de producto (%)	Retirada de proteína A (veces)	Proteína de célula hospedadora (VLR)
Pasada 1	0,0	Flujo continuo	30	760	0	93	0	0,58
Pasada 2	0,9	Reparto débil	30	200	3,0	96	NA	0,57
Pasada 3	1,1	Reparto débil	10	700	3,2	94	1,7	0,9
Pasada 4	1,7	Reparto débil	20	200	3,1	94	NA	0,83
Pasada 5	3,0	Reparto débil	8	500	3,0	100	1,9	1,3
Pasada 6	3,2	Reparto débil	10	350	3,6	94	2,1	1,5
Pasada 7	3,7	Reparto débil	5	750	3,3	99	2,4	1,2
Pasada 8	5,8	Reparto débil	30	50	10,7	95	2,1	1,2
Pasada 9	7,3	Reparto débil	10	200	10,2	94	2,4	1,2
Pasada 10	27,8	Unión fuerte	10	50	16,3	91	2,1	1,2
Pasada 11	32,7	Unión fuerte	8	50	21,6	86	2,4	1,4
Pasada 12	49,2	Unión fuerte	5	50	24,6	79	2,1	1,6

Resulta evidente a partir de los datos presentados en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11 que el rendimiento de la etapa de cHA mejora significativamente con respecto a la reducción de contaminantes a medida que se pasa de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de reparto débil, al tiempo que la recuperación de producto es comparable. La operación en las condiciones correspondientes a un aumento adicional en el coeficiente de reparto (es decir, la operación en la región de unión) no proporciona ningún beneficio adicional con respecto a la retirada de contaminantes. Sin embargo, la recuperación de producto a través de la etapa comienza a descender en las condiciones de unión fuerte. Por tanto, la ventana de operación óptima de esta separación corresponde a la de la cromatografía de reparto débil. En estas condiciones, se obtuvo una reducción de  $> 2$  log de proteína A y una reducción de  $> 1,2$  log de proteína de célula hospedadora en una prueba de carga de 100 mg de producto/ml de resina. Los niveles de producto unido en las condiciones de reparto débil, en este ejemplo, estaban entre 3,0-10,2 mg/ml de la resina.

#### Resumen

Se mostró que un tercer modo de cromatografía (hidroxiapatita) opera con éxito en un modo de reparto débil. La proteína A y PCH se unen más fuertemente que el anticuerpo de producto a la resina cerámica y se conservan fuertemente en condiciones de RD. Los valores más altos de  $K_p$  en la región de RD están entre 10 y 20, en algunos casos, lo que sigue proporcionando una buena recuperación de producto ( $> 90$  %). Los niveles más bajos de  $K_p$  dan recuperaciones correspondientemente más altas.

En este ejemplo, se mostró que el rendimiento de la etapa de columna se puede optimizar principalmente a través de

la elección del coeficiente de reparto usado para la pasada por la columna. El coeficiente de reparto en hidroxiapatita es una función compleja de los componentes del pH, la sal (el tipo y la concentración), el fosfato y el tampón. Todas estas variables, en general, tienen un impacto en el rendimiento de la etapa de columna. El enfoque presentado en el presente documento proporciona un medio sencillo de relacionar el impacto del cambio de una cualquiera de estas variables con el rendimiento de columna. El enfoque de 'coeficiente de reparto' unificado presentado en este ejemplo abre la posibilidad de operar en un espacio de operación más amplio en este modo de cromatografía que el que se ha hecho antes. Las condiciones de reparto débil de un rendimiento óptimo se pueden identificar fácilmente usando los procedimientos de CAP descritos anteriormente.

### **Serie 6: hidroxiapatita usando hidroxiapatita cerámica tipo I y Mab-A5T**

#### 10 *Experimento 6.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de RD y FC*

Se realizó un cribado de alta productividad (CAP) para identificar las condiciones de reparto débil y de flujo continuo de Mab-A5T con un medio de hidroxiapatita cerámica. Este cribado varió las concentraciones de pH, cloruro de sodio y fosfato de sodio para determinar su efecto sobre el grado de unión de MAB-A5T al medio de hidroxiapatita.

15 Se añadieron 50 µl de medio de hidroxiapatita cerámica a 36 pocillos de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo se equilibró en soluciones constituidas por las concentraciones adecuadas de cloruro de sodio y fosfato de sodio en un tampón de HEPES 50 mM que contenía arginina 50 mM a pH 7,0 o pH 8,0. Las concentraciones de las dos sales en la solución se muestran en las Tablas 6.1.1 y 6.1.2. Las condiciones mostradas en las columnas 1-3 se realizaron a pH 7,0 y en las columnas 4-6 se realizaron a pH 8,0. La prueba de carga de MAB-A5T en cada uno de estos pocillos fue de 5,0 mg/ml de resina.

20

**Tabla 6.1.1: niveles de cloruro de sodio en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4	5	6
	pH 7,0			pH 8,0		
<b>A</b>	50	400	400	50	400	400
<b>B</b>	50	50	400	50	50	400
<b>C</b>	50	50		50	50	
<b>D</b>	100	50		100	50	
<b>E</b>	100	100		100	100	
<b>F</b>	100	100		100	100	
<b>G</b>	400	100		400	100	
<b>H</b>	400	400		400	400	

**Tabla 6.1.2: niveles de fosfato de sodio en cada pocillo (en mM)**

	1	2	3	4	5	6
	pH 7,0			pH 8,0		
<b>A</b>	2	32	8	2	32	8
<b>B</b>	8	2	32	8	2	32
<b>C</b>	32	8		32	8	
<b>D</b>	2	32		2	32	
<b>E</b>	8	2		8	2	
<b>F</b>	32	8		32	8	
<b>G</b>	2	32		2	32	
<b>H</b>	8	2		8	2	

25 En la primera fase del experimento de CAP, cada pocillo se equilibró en las condiciones de cloruro de sodio, fosfato de sodio y pH descritas en las Tablas 6.1.1 y 6.1.2 en una relación en volumen de fase de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina). La placa se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que se consiguiera el equilibrio. A continuación, se retiró la solución mediante la centrifugación de la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

30 En la segunda fase, la resina en cada pocillo se sometió a prueba con una solución concentrada de Mab-A5T en la prueba adecuada de carga de proteína con una relación en volumen de 6:1 (300 µl de solución: 50 µl de resina) a la concentración de cloruro de sodio y fosfato de sodio y pH adecuada. Se usó como solución madre una solución de 6,9 mg/ml de Mab-A5T en HEPES 1 mM, NaCl 100 mM, a pH 7,0. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que la resina y la solución se equilibraran. El sobrenadante se retiró de la placa de filtro mediante centrifugación y se recogió en una placa de recogida. La concentración de proteína en el sobrenadante en cada pocillo se determinó mediante absorbancia a A280 nm.

35 En la tercera fase, la resina se lavó mediante la adición de soluciones de las condiciones especificadas de cloruro de sodio, fosfato de sodio y pH enumeradas en las Tablas 6.1.1 y 6.1.2. El sobrenadante se retiró después de agitar durante 20 minutos.

En la cuarta fase, un tampón que comprendía fosfato de sodio 100 mM, NaCl 1 M, a pH 7,2 se añadió para retirar la proteína restante que se unió a la resina. Los coeficientes de reparto se calcularon en cada pocillo usando la masa eluida de la Fase 4 y la concentración de producto de la Fase 2 y se muestran en la Tabla 6.1.3.

**Tabla 6.1.3: coeficientes de reparto (Kp) para el cribado CAP de MAB-A5T**

	1	2	3	4	5	6
	pH 7,0			pH 8,0		
<b>A</b>	142,7	0,1	1,6	50,2	0,0	0,3
<b>B</b>	90,6	144,3	0,1	9,9	44,7	0,0
<b>C</b>	12,1	84,5		1,0	13,7	
<b>D</b>	90,5	10,4		22,2	1,1	
<b>E</b>	27,5	94,1		4,3	21,9	
<b>F</b>	2,5	28,0		0,3	4,3	
<b>G</b>	15,1	2,1		2,2	0,4	
<b>H</b>	1,2	15,1		0,4	2,0	

- 5 Tal como se muestra en la Tabla 6.1.3, el valor de Kp se puede usar para identificar regiones en las que MAB-A5T se une al medio de hidroxiapatita con diferentes resistencias. La resistencia de la unión de MAB-A5T al medio de hidroxiapatita cerámica se puede manipular mediante la variación de las condiciones de NaCl, fosfato y pH en las zonas de flujo continuo, reparto débil y unión.

*Experimento 6.2: pasadas por columna en condiciones de RD*

- 10 Se realizaron experimentos para resaltar el rendimiento superior de la etapa de cHA en condiciones de reparto débil. Por lo tanto, los experimentos se realizaron en las condiciones correspondientes a un intervalo de coeficientes de reparto identificados mediante el cribado CAP (Experimento 6.1). Se realizaron ocho pasadas, con pruebas de carga de producto de 110 mg/ml de resina.

Cromatografía de proteína A de MabSelect

- 15 El cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó usando una columna MabSelect. Una columna de proteína A de MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM/NaCl 150 mM, a pH 7,5, a un caudal de 300 cm/h. A continuación, se cargó la columna en una prueba de carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. A esto le siguió un lavado de 5 VC en NaCl 1 M, Tris 50 mM, a pH 7,5 y un lavado de 5 VC que contenía Tris 10 mM, NaCl 75 mM, lavado a pH 7,5. A continuación, se eluyó la columna usando arginina 100 mM, NaCl 50 mM, a pH 3,0. El agrupamiento de productos se neutralizó hasta pH 7,2 usando HEPES 2 M a pH 8,0.

Cromatografía de hidroxiapatita cerámica

- 25 Los agrupamientos de anticuerpos parcialmente purificados de la etapa de proteína A se purificaron adicionalmente sobre hidroxiapatita. El diámetro de columna fue de 0,5 cm y la altura de columna fue de 10 cm. En todas las etapas de cromatografía de hidroxiapatita descritas en la serie de Experimento 6, se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

Caudal operativo: 150 - 240 cm/h

- Equilibrio 1      fosfato de sodio 300 mM, NaCl 1,0 M, a pH 6,8 (3 volúmenes de columna)
- Equilibrio 2      fosfato de sodio 2 - 32 mM, NaCl 50 - 400 mM, imidazol 5 mM, glicina 50 mM, HEPES 10 mM, a pH 7,0 (5 volúmenes de columna)
- Lavado            igual que el Equilibrio 2.

- 30 La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del tampón de equilibrio 1, seguido de otra etapa de equilibrio 2. A continuación, se cargó la columna en 110 mg de producto/ml de resina con el pico de proteína A de la etapa anterior (que se ajustó con el tampón de equilibrio 2 adecuado) y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 6.2.1 y la Figura 12.

**Tabla 6.2.1: coeficientes de reparto de MAB-A5T en resina de cHA y la ventana de operación correspondiente.**

	Coeficiente de reparto Kp	Producto unido mg/ml	Modo de operación	Phos mM	NaCl mM	pH
Pasada 1	0,1	0	Flujo continuo	32	400	7,0
Pasada 2	0,7	1,6	Reparto débil	32	170	7,0
Pasada 3	1,4	2,2	Reparto débil	32	120	7,0
Pasada 4	2,1	1,6	Reparto débil	2	400	7,0
Pasada 5	13,7	7,0	Reparto débil	8	50	8,0
Pasada 6	22	6,7	Reparto débil	2	100	8,0
Pasada 7	54	12,8	Unión fuerte	2	60	8,0
Pasada 8	>100	16	Unión fuerte	2	50	7,0

Las condiciones de operación en estos experimentos corresponden a las regiones de flujo continuo, reparto débil (RD) y de unión. El experimento de CAP descrito en el Experimento 6.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto (Kp) en estas condiciones de concentraciones de pH, cloruro y fosfato. Las pasadas en la Tabla 6.2.1 se clasifican según los coeficientes de reparto. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación del producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado. Los resultados de la retirada de PCH y de PMA en relación con el producto, así como la recuperación de producto, a partir de estos experimentos se presentan en la Figura 12.

A partir de los datos presentados en la Figura 12, resulta evidente que el rendimiento de la etapa de cHA mejora significativamente con respecto a la reducción de PCH y PMA a medida que se avanza de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de reparto débil, al tiempo que la recuperación de producto se mantiene al > 80 %. La operación en las condiciones correspondientes a un aumento adicional en el coeficiente de reparto (es decir, la operación en la región de unión) no proporciona ningún beneficio adicional con respecto a la retirada de contaminantes. Sin embargo, la recuperación de producto a través de la etapa comienza a descender en las condiciones de unión fuerte. Por tanto, la ventana de operación óptima de esta separación corresponde a la de la cromatografía de reparto débil. En estas condiciones, se obtuvo una reducción de 4 veces de las especies de PMA relacionadas con el producto y una reducción de >1,4 log de PCH en una prueba de carga de 110 mg de producto/ml de resina. Los niveles de producto unido en las condiciones de reparto débil, en este ejemplo, estaban entre 1,6-6,7 mg/ml de la resina.

### Resumen

Se presentó un segundo ejemplo en hidroxiapatita en el que se mostró que la operación en cromatografía de reparto débil proporciona un rendimiento mejorado con respecto a la reducción de PCH y PMA y la recuperación de producto (> 80 %). Tal como en los ejemplos anteriores, el rendimiento de la etapa se optimizó principalmente a través de la elección de los coeficientes de reparto usados para la pasada por la columna. El enfoque presentado en el presente documento proporciona un medio sencillo de relacionar el impacto del cambio de una cualquiera de varias variables (pH, sal, fosfato, imidazol, glicina, HEPES, etc.) con el rendimiento de columna. Las condiciones de reparto débil de un rendimiento óptimo se pueden identificar fácilmente usando los procedimientos de CAP descritos en este ejemplo. El enfoque presentado en el presente documento abre la posibilidad de operar en un espacio de operación más amplio en este modo de cromatografía que el que se ha hecho antes. La región de RD óptima en este ejemplo corresponde a coeficientes de reparto entre 2 y 20.

### **Serie 7: hidroxiapatita usando hidroxiapatita cerámica tipo I y Mab-MYO**

#### *Experimento 7.1: cribado de alta productividad para establecer las condiciones de FC, RD y unión fuerte*

Se realizó un cribado de alta productividad (CAP) para identificar las condiciones de flujo continuo, reparto débil y unión de Mab-MYO con un medio de hidroxiapatita cerámica. Este cribado varió la concentración de pH, arginina/glicina, HEPES, fosfato de sodio y cloruro de sodio para determinar su efecto sobre el grado de unión de MAB-MYO al medio de hidroxiapatita.

Los procedimientos de CAP usados en este ejemplo fueron similares a aquellos descritos en la Serie 5 y la Serie 6 y no se analizan en el presente documento. Los valores de Kp previstos derivados de un ajuste de superficie de respuesta a los datos de CAP se usaron para elegir las condiciones específicas para los experimentos de columna.

#### *Experimento 7.2: pasadas por columna en condiciones de RD*

Los experimentos analizados en el presente documento se realizaron en condiciones que correspondían a un intervalo de coeficientes de reparto identificados mediante los experimentos de CAP. Estos experimentos se realizaron específicamente para resaltar el rendimiento superior de la etapa de cHA en condiciones de reparto débil para la retirada de PCH y especies de PMA relacionadas con el producto. Se realizaron cuatro pasadas con una prueba de carga de producto de 55 mg/ml de resina. La prueba de carga usada en estos experimentos es baja para la

cromatografía de reparto débil, pero es típica para la operación de flujo continuo. No se hizo ningún intento en estos experimentos de optimizar la prueba de carga para la cromatografía de reparto débil.

Los agrupamientos de anticuerpos parcialmente purificados de la etapa de proteína A se usaron en estos experimentos. El diámetro de columna fue de 0,5 cm y la altura de columna fue de 10 cm.

- 5 En todas las etapas de cromatografía de hidroxapatita descritas en la serie de Experimento 7, se usaron las siguientes condiciones (se observan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

Caudal operativo: 150 - 240 cm/h

Equilibrio 1 fosfato de sodio 300 mM, NaCl 1,0 M, a pH 6,8 (2-5 volúmenes de columna)

Equilibrio 2 fosfato de sodio 1 - 8 mM, NaCl 50 - 1750 mM, Arg 12 - 50 mM, HEPES 20-50 mM a pH 7,0 (5 volúmenes de columna)

Lavado igual que el Equilibrio 2

- 10 La columna se equilibró con 2-5 volúmenes de columna de tampón de Equilibrio 1, seguido de 5 volúmenes de columna de Equilibrio 2. A continuación, se cargó la columna en 55 mg de producto/ml de resina con el pico de proteína A (que se ajustó con el tampón de equilibrio 2 adecuado) y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 7.2.1 y la Figura 13.

**Tabla 7.2.1: coeficientes de reparto de MAB-MYO en resina de cHA y el modo de operación correspondiente**

	Coeficiente de reparto Kp	Modo de operación	Arg mM	Hepes mM	Phos mM	NaCl mM	Producto unido mg/ml
Pasada 1	3,6	Reparto débil	50	20	8	300	5,1
Pasada 2	4,2	Reparto débil	50	20	2	600	8,2
Pasada 3	8,9*	Reparto débil	12	20	1	1.750	9,5
Pasada 4	>100	Unión fuerte	50	50	5	50	41,6

\* Condición de Kp óptima, véase la Figura 13

- 15 Las condiciones de operación en estos experimentos corresponden a las regiones de flujo continuo, reparto débil (RD) y unión. El experimento de CAP descrito en el Experimento 7.1 proporciona estimaciones del valor del coeficiente de reparto (Kp) en estas condiciones de concentración de pH, cloruro, fosfato, glicina / arginina y HEPES. Las pasadas en la Tabla 7.2.1 se clasifican según los coeficientes de reparto. El producto unido se determinó mediante la medición de la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación del producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado. Los resultados de la retirada de peso molecular alto (PMA) relacionado con el producto y de recuperación de producto a partir de estos experimentos se presentan en la Figura 13.

- 20 Resulta evidente a partir de los datos presentados en la Figura 13 que el rendimiento de la etapa de cHA mejora significativamente con respecto a la reducción de PMA a medida que se pasa de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de reparto débil, al tiempo que la recuperación de producto es del >80 %. La operación en las condiciones correspondientes a un aumento adicional en el coeficiente de reparto (es decir, la operación en la región de unión) no proporciona ningún beneficio adicional con respecto a la retirada de contaminantes. Sin embargo, la recuperación de producto a través de la etapa comienza a descender en las condiciones de unión fuerte. Por tanto, la ventana de operación óptima de esta separación corresponde a la de la cromatografía de reparto débil. En estas condiciones, se obtuvo una reducción de 20 veces de las especies de PMA relacionadas con el producto. Los niveles de producto unido en las condiciones de reparto débil, en este ejemplo, estaban entre 5,1-9,5 mg/ml de la resina.

30 *Resumen*

- Se presentó un segundo ejemplo en hidroxapatita en el que se mostró que la operación en cromatografía de reparto débil proporciona un rendimiento mejorado con respecto a la reducción de PMA con una buena recuperación de producto (> 80 %). Las especies de PMA relacionadas con el producto y las especies de PMA se unen más fuertemente a la resina cerámica que el anticuerpo de producto y se conserva fuertemente en condiciones de RD. La región de RD, en este ejemplo, corresponde a coeficientes de reparto entre 8 y 20.

- 40 Una vez más, se mostró que el rendimiento de la etapa de columna se puede optimizar principalmente a través de la elección de los coeficientes de reparto usados para la pasada por la columna. El enfoque presentado en el presente documento proporciona un medio sencillo de relacionar el impacto del cambio de una cualquiera de varias variables (pH, sal, fosfato, arginina, HEPES, etc.) con el rendimiento de columna. Las condiciones de reparto débil de un rendimiento óptimo se pueden identificar fácilmente usando los procedimientos de CAP descritos en este ejemplo. El enfoque presentado en el presente documento abre la posibilidad de operar en un espacio de operación más amplio

en este modo de cromatografía que el que se ha hecho antes.

También cabe señalar en el presente documento que el concepto de cromatografía de reparto débil también funciona en sistemas que no son accionados solo mediante interacciones de carga. El enfoque general descrito en la presente solicitud se puede aplicar con éxito a sistemas complejos, tales como CIH e hidroxiapatita también. Por ejemplo, además del pH de operación, varias variables de otro tipo, tales como el NaCl, las sales de fosfato, la arginina/glicina, las especies de tampón, así como el tipo de resina, pueden afectar, en conjunto, al rendimiento de etapa en la hidroxiapatita.

No obstante, se podría identificar fácilmente la ventana de RD mediante la realización de experimentos de unión de lotes sencillos con el producto de interés solo.

10 **Serie 8: tampón de iones híbridos para la elución de proteína A y etapas posteriores de intercambio de iones**

Un cultivo que contenía un anticuerpo monoclonal se purificó usando resina de MabSelect. Una columna de proteína A de MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM/NaCl 150 mM, a pH 7,5. A continuación, se cargó la columna a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. A esto le siguió un lavado de 5 VC en NaCl 1 M, Tris 50 mM, a pH 7,5 y un lavado de 5 VC que contenía Tris 10 mM, NaCl 75 mM, lavado a pH 7,5. A continuación, se eluyó la columna usando HEPES 30 mM, a pH 3,1. El agrupamiento de productos se neutralizó hasta pH 7,2 usando HEPES 1 M a pH 8,0, lo que dio como resultado una concentración total de HEPES de 55 mM. A un pH 7,2, el HEPES aporta una resistencia iónica de 17 mM al tampón.

15

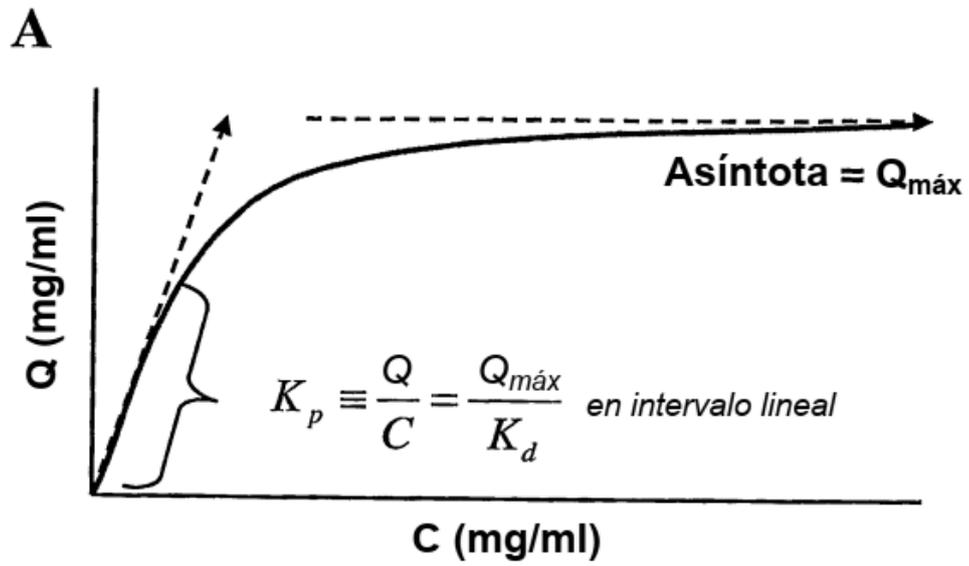
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de recuperación de un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:
  - 5 hacer pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que hacen que el medio se una al menos a entre 1 y 70 mg de producto por ml de medio y se definen mediante un coeficiente de reparto de 0,3 a 20; y
  - recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las condiciones de operación se identifican en una etapa de cribado.
3. Un procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las condiciones de operación hacen que el medio se una al menos a 5 mg de producto por ml de medio, al menos a 10 mg de producto por ml de medio, al menos a 20 mg de producto por ml de medio, al menos a 30 mg de producto por ml de medio, al menos a 40 mg de producto por ml de medio, al menos a 50 mg de producto por ml de medio o al menos a 60 mg de producto por ml de medio.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el valor del coeficiente de reparto está en el intervalo de 0,5 a 5,0, de 1,0 a 5,0 o de 0,5 a 1,5.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto purificado es una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas, interleucinas, hormonas y enzimas terapéuticas.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto purificado es un anticuerpo.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio comprende un medio de intercambio de iones cargado, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, una resina de hidroxiapatita o una resina de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el medio de intercambio de iones cargado es una resina de intercambio de aniones o una resina de intercambio de cationes.
- 25 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la una o más impurezas se seleccionan del grupo que consiste en proteínas de célula hospedadora, ácidos nucleicos, variantes de producto, endotoxinas, proteína A y virus.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que un fluido que contiene producto se eluye de una columna de proteína A usando un tampón de elución de resistencia iónica baja; el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajustan usando un tampón de neutralización que da como resultado no más de 20 mM de la resistencia iónica del fluido que contiene producto, lo que da como resultado el fluido de carga, y en el que tal fluido de carga se hace pasar a través de un medio de intercambio de iones.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el tampón de elución comprende moléculas con un grupo aniónico cargado con un pKa de 2-5.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el tampón de elución comprende, además, moléculas con un grupo catiónico cargado con un pKa de 6,5-10.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el tampón de elución comprende una molécula que es un ion híbrido a pH 4 a 9.
- 40 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el ion híbrido se selecciona del grupo que consiste en glicina; 1,4-piperazinbis-(ácido etanosulfónico); glicilglicina; ácido ciclopentanotetra-1,2,3,4-carboxílico; ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico; ácido 2-(N-morfolino)propano-sulfónico; ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico; ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropano sulfónico; N-tris(hidroximetil)metilglicina; glicinamida; N,N-bis(2-hidroxietil)glicina; ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminopropano sulfónico; y N-glicil-glicina.
- 45 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el ion híbrido es glicina.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el producto se carga en el medio a una concentración de al menos 100 mg de producto por ml de medio, al menos 500 mg de producto por ml de medio o al menos 1.000 mg de producto por ml de medio.
- 50 17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la concentración de producto en el fluido de carga es de al menos 1 mg de producto por ml de fluido de carga, al menos 5 mg de producto por ml de fluido de

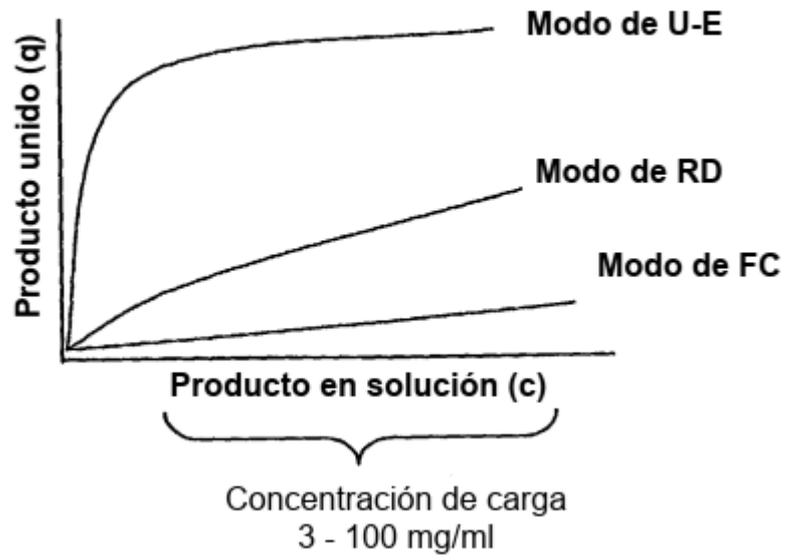
## ES 2 797 480 T3

carga, al menos 10 mg de producto por ml de fluido de carga, al menos 50 mg de producto por ml de fluido de carga o al menos 100 mg de producto por ml de fluido de carga.

**FIGURA 1**

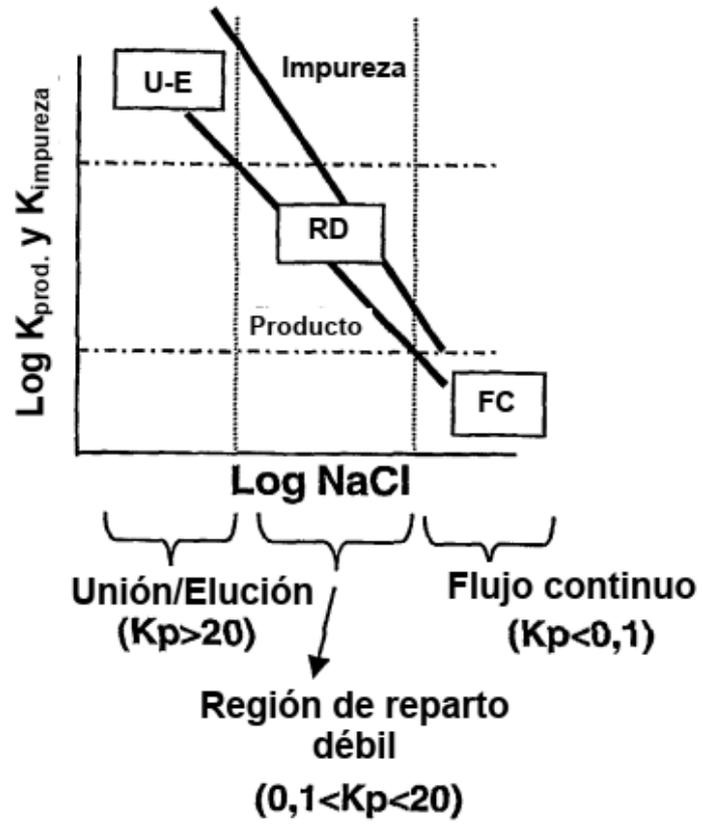


**1B**

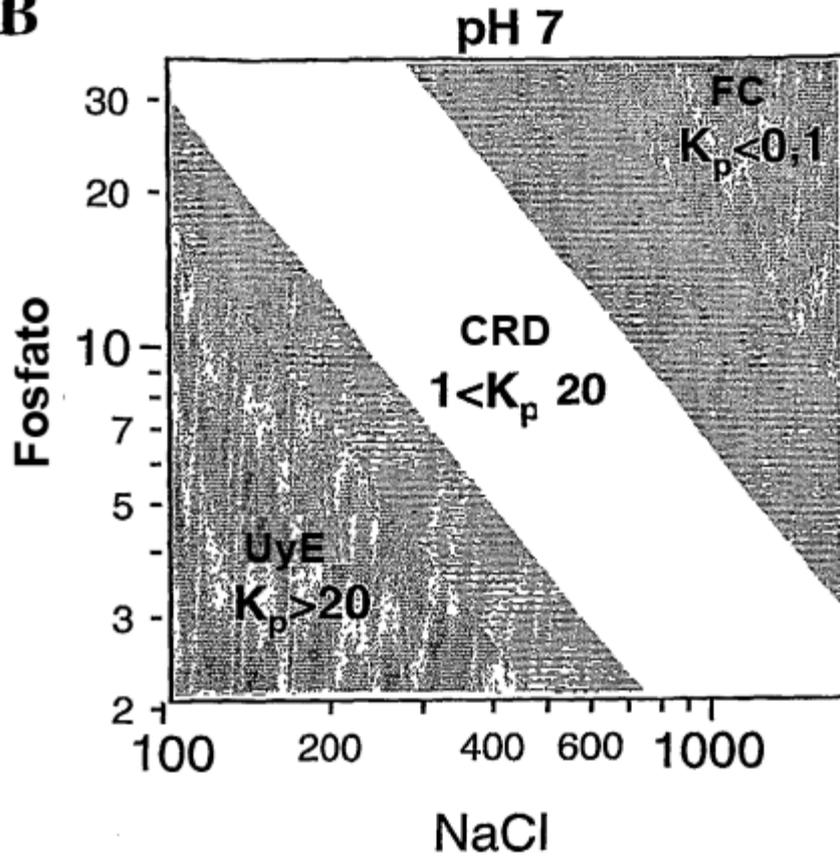


**FIGURA 2**

**A**



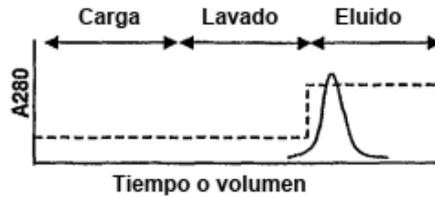
**2B**



**FIGURA 3**

• **Unión-elución (U-E)**

- ▶  $K_{\text{prod.}} \text{ alto } > 20$
- ▶ Límite de capacidad: masa de producto en la resina (no volumen de carga)
- ▶ Cambio en la fase móvil para eluir el producto



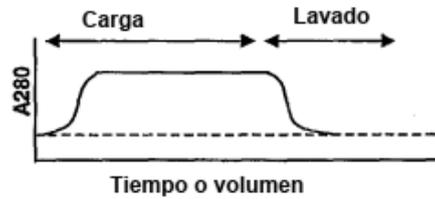
• **Flujo continuo (FC)**

- ▶  $K_{\text{prod.}} \text{ muy bajo } > 0,1$
- ▶ Límite de capacidad: avance de impurezas y volumen
- ▶ Isocrático
- ▶ Cromatograma con rápido avance, lavado

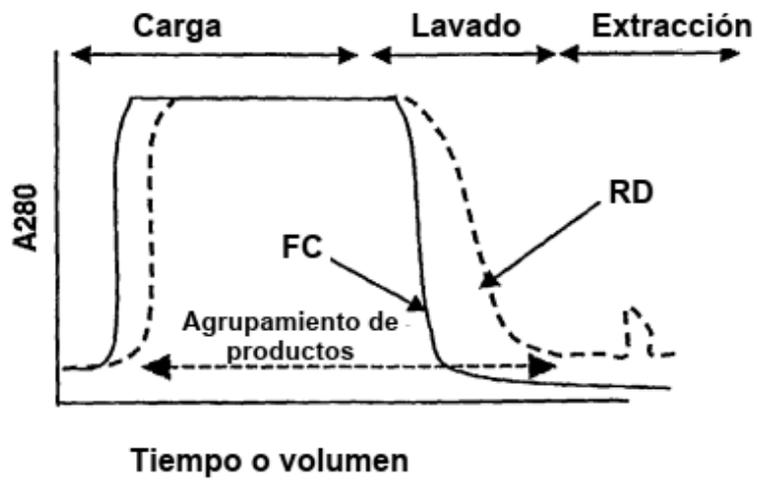


• **Reparto débil (RD)**

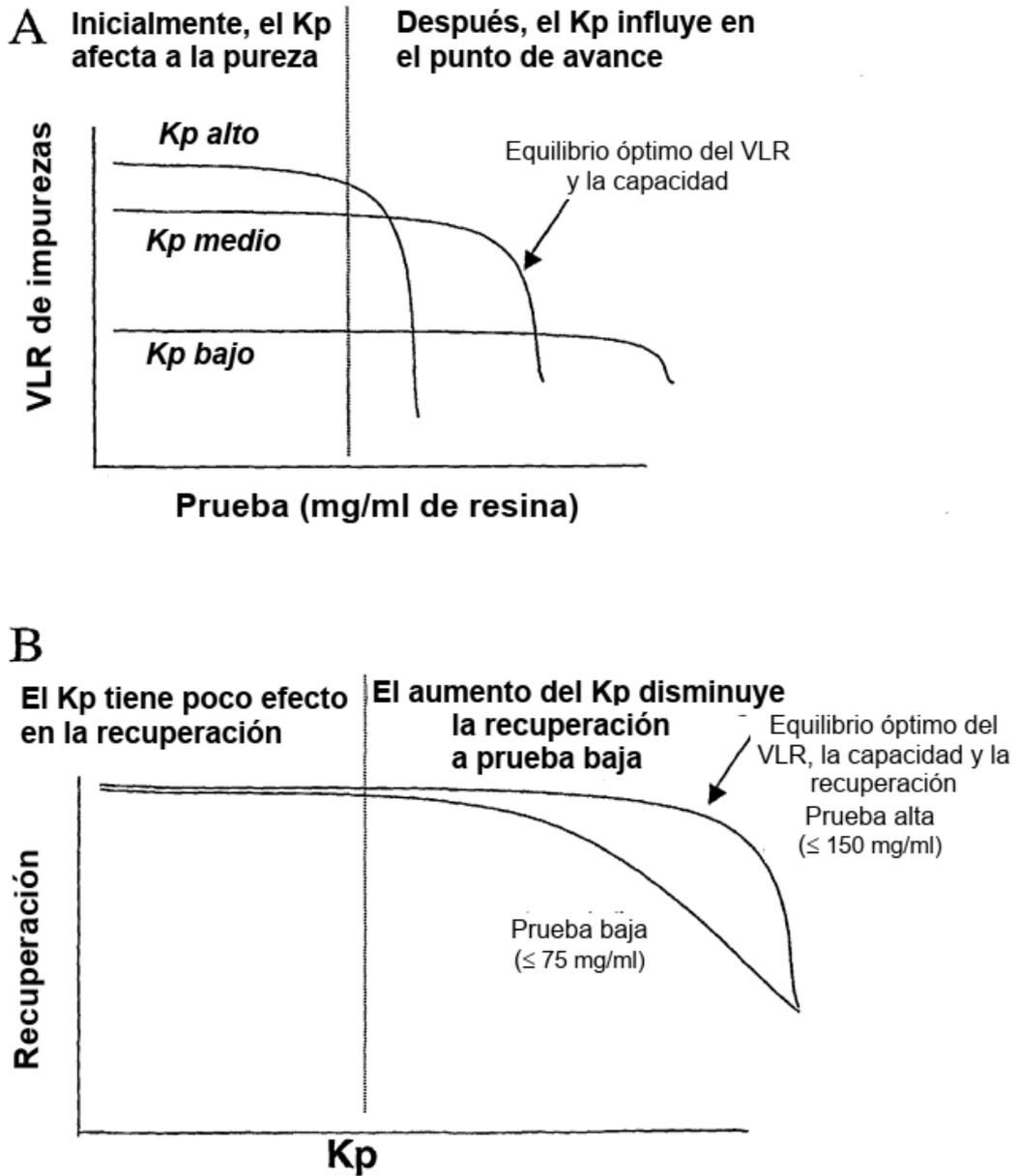
- ▶  $K_{\text{prod.}} \text{ intermedio } 0,1 < K < 20$
- ▶ Capacidad mejorada con respecto al modo de FC (tanto masa como volumen de carga)
- ▶ Isocrático
- ▶ Avance retardado, disminución de lavado



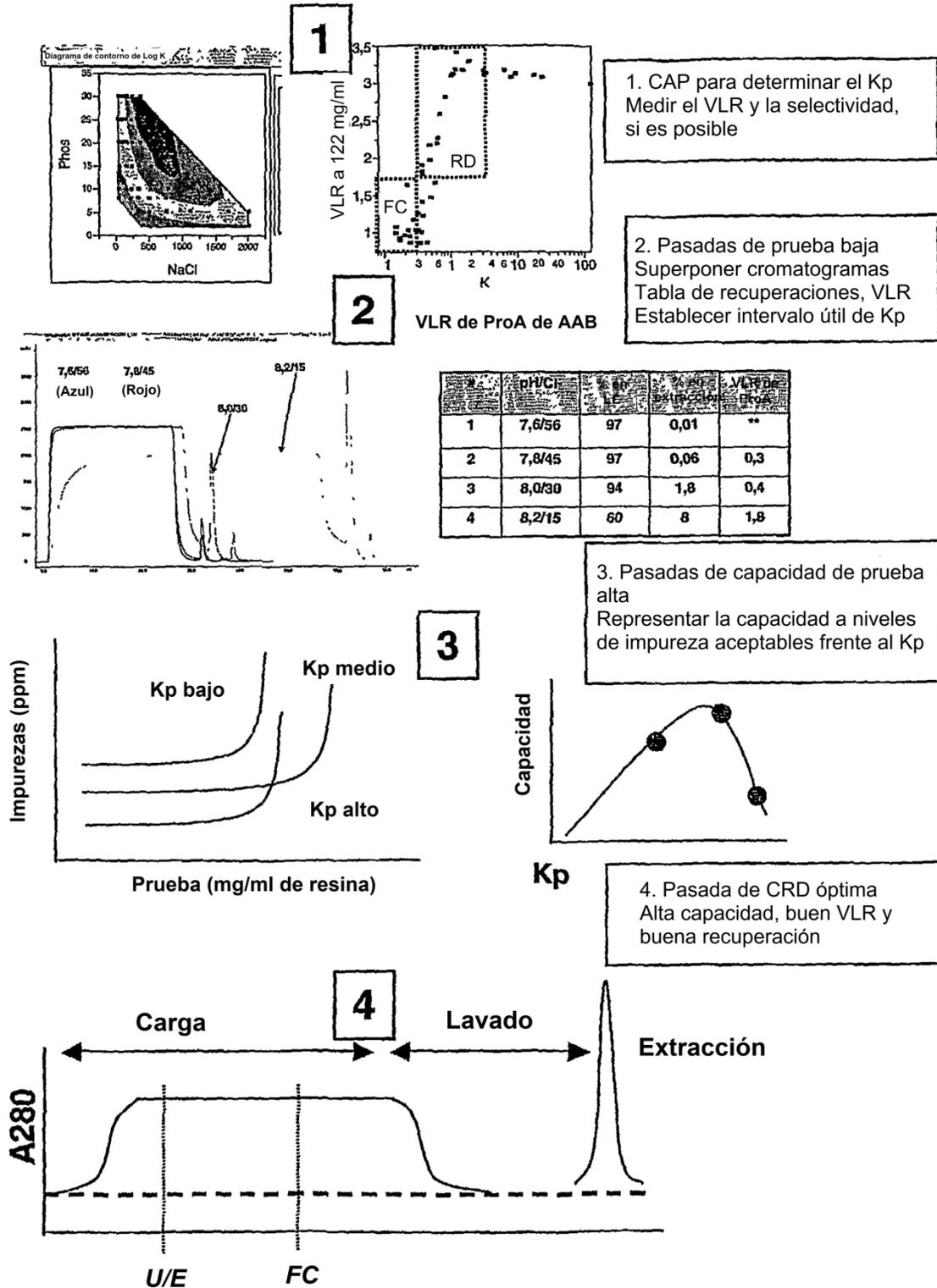
**FIGURA 4**



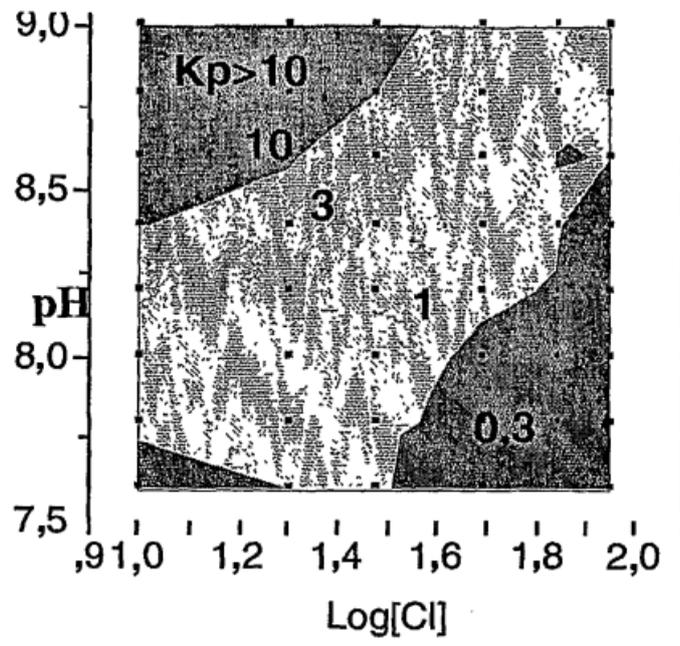
**FIGURA 5**



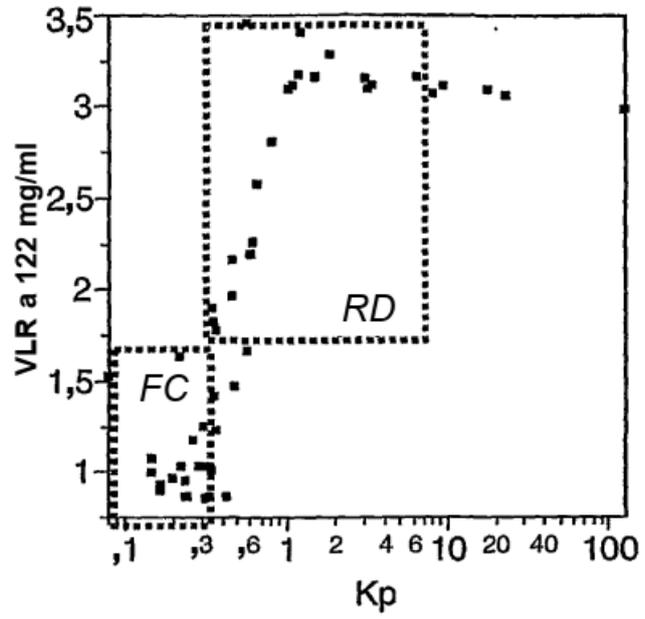
**FIGURA 6**



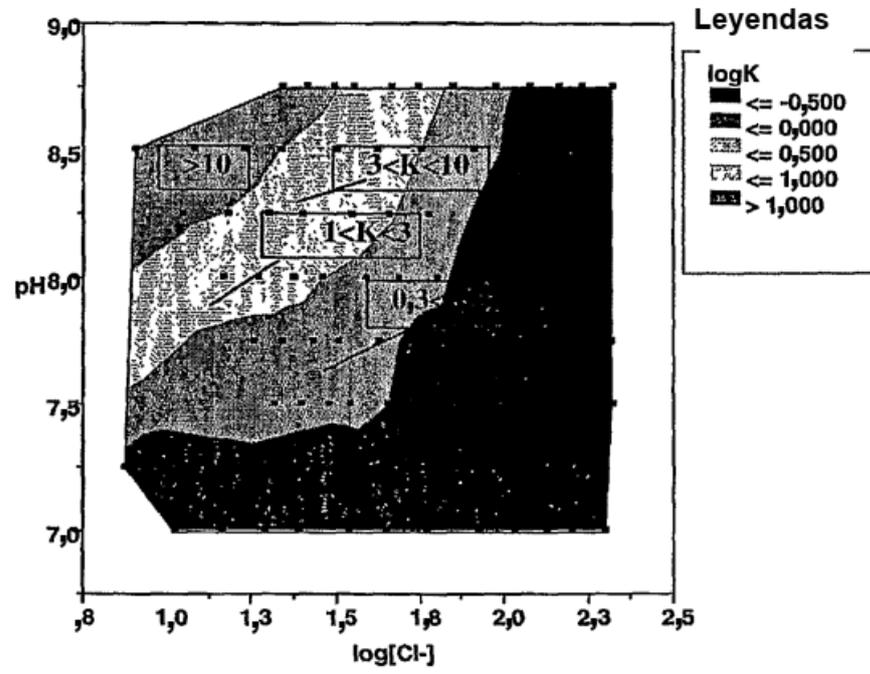
**FIGURA 7**



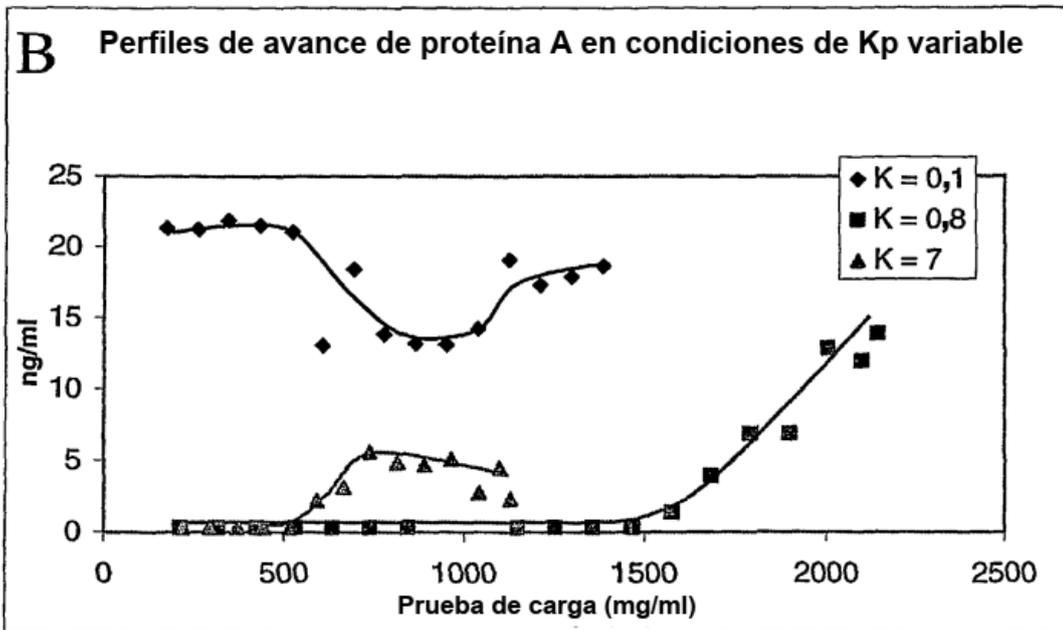
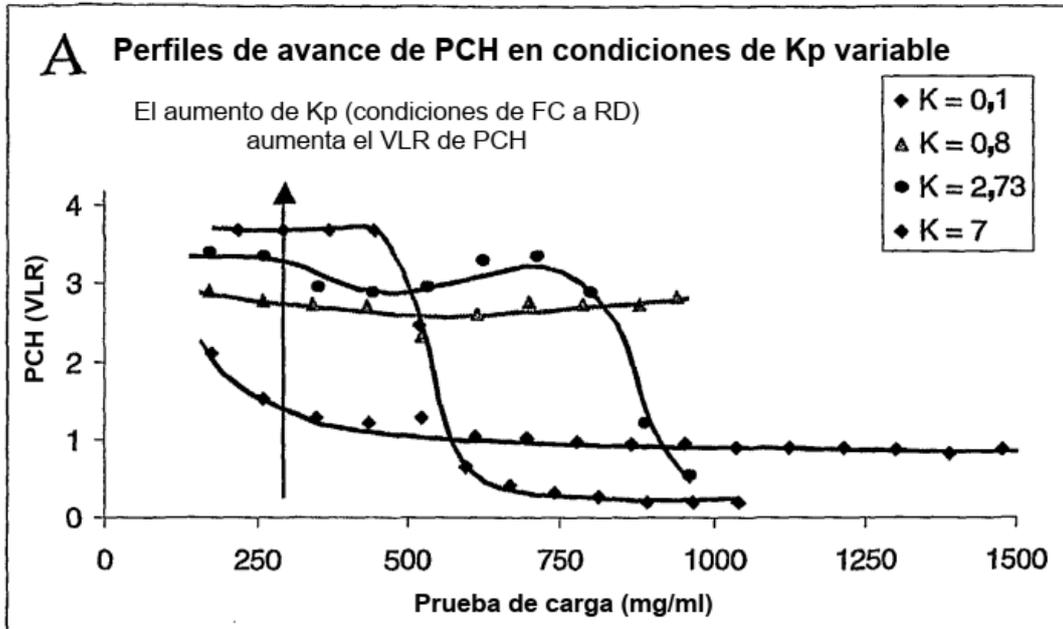
**FIGURA 8**



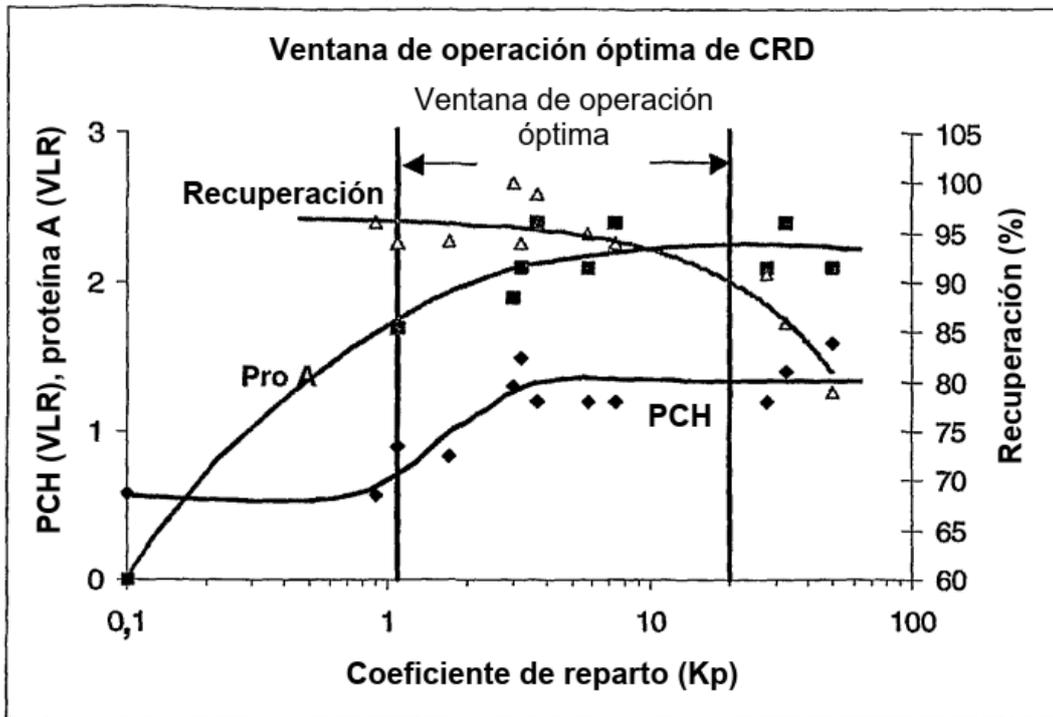
**FIGURA 9**



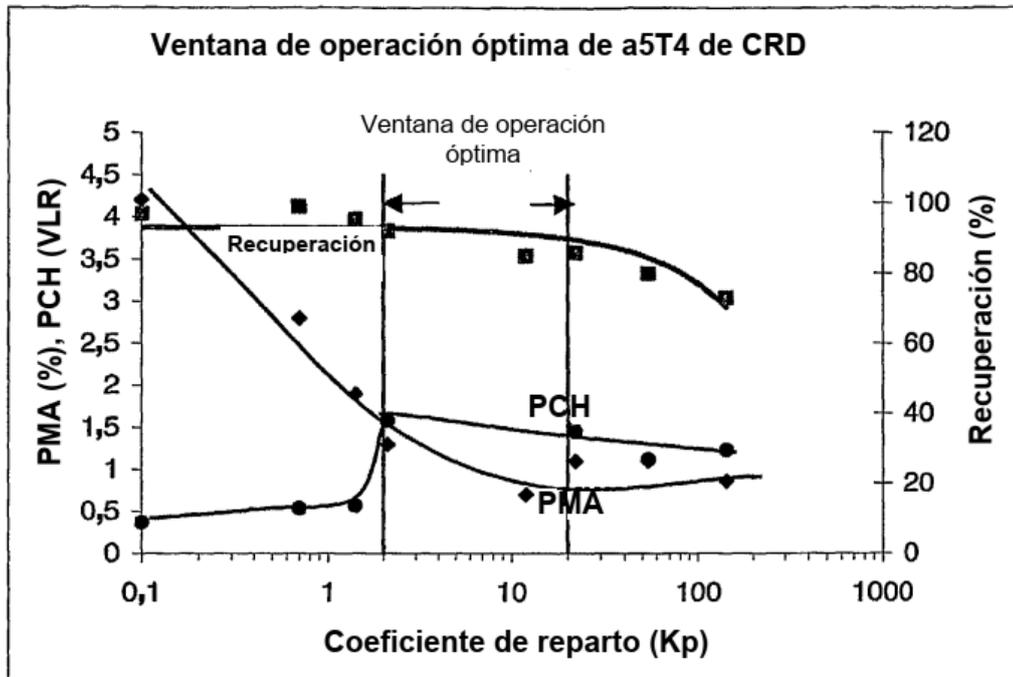
**Figura 10**



**Figura 11**



**FIGURA 12**



**Figura 13**

