

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 725**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2015 PCT/US2015/042241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16015048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2015 E 15750191 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3172220**

54 Título: **Método para purificar anticuerpos**

30 Prioridad:

25.07.2014 US 201462028994 P

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

01.03.2021

73 Titular/es:

**UNITED THERAPEUTICS CORPORATION (50.0%)
1040 Spring Street
Silver Spring, MD 20910, US y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MEH, DAVID;
ATOLAGBE, TIMOTHY;
FARQUHARSON, G. MARK;
SHABAN, SAMIR;
KOLECK, MARY y
MITRA, GEORGE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 808 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para purificar anticuerpos

5 Antecedentes de la invención

A menudo se requieren procedimientos conocidos para purificar anticuerpos monoclonales y otros materiales biológicos para retirar impurezas no deseadas, que es particularmente importante cuando el producto biológico se produce para usos terapéuticos. Una manera de retirar impurezas es a través de diafiltración. La diafiltración se conoce en la técnica y se describe en, por ejemplo, Wayne P. Olson, Separations Technology: Pharmaceutical and Biotechnology Applications (Interpharm Press 1995); Munir Cheryan, Ultrafiltration and Microfiltration Handbook (2ª ed. CRC Press 1998); Stefan Behme, Manufacturing of Pharmaceutical Proteins (Wiley-VCH 2009); y Glyn N. Stacey, Medicines from Animal Cell Culture (John Wiley 2007).

Ch14.18 (también denominado en el presente documento "dinutuximab") es un anticuerpo monoclonal anti-GD₂ y se ha descrito Gillies *et al.*, Journal of Immunological Methods 125:191-202 (1989). Cuando se usa el anticuerpo ch14.18 para fines terapéuticos, es importante retirar impurezas tales como bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-tris) para garantizar la seguridad y eficacia del anticuerpo monoclonal. Por tanto, existe la necesidad de métodos para retirar impurezas no deseadas de composiciones biológicas.

20 Sumario de la invención

La invención descrita en el presente documento se refiere a un método para purificar una composición biológica, que comprende someter a diafiltración la composición biológica con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para obtener una composición purificada, en el que la composición biológica comprende un anticuerpo monoclonal ch14.18.

En una realización, el anticuerpo monoclonal ch14.18 es una proteína aislada.

En una realización, la composición biológica comprende además al menos una impureza. En una realización, la impureza es bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (Bis-tris). En una realización, la concentración de Bis-tris en la composición biológica es Bis-tris de 10 a 50 mM a un pH de 6,3 a 6,7.

En una realización, la diafiltración retira al menos el 50% de Bis-tris de la composición biológica. En una realización, la diafiltración retira al menos el 70% de Bis-tris de la composición biológica.

En una realización, la concentración de PBS es fosfato de sodio de 10 a 50 mM y NaCl de 100 a 200 mM.

En una realización, el anticuerpo monoclonal se concentra hasta una concentración de al menos 2,0 a 5,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS. En una realización, el anticuerpo monoclonal se concentra hasta una concentración de al menos 4,0 a 6,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS.

En una realización, el método comprende además aislar y purificar el anticuerpo monoclonal usando al menos una columna de cromatografía.

En una realización, el método comprende aislar y purificar el anticuerpo monoclonal usando al menos una columna de cromatografía por afinidad, al menos una columna de cromatografía de intercambio catiónico y/o al menos una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En una realización, la columna de cromatografía de intercambio aniónico es una columna Capto™ adhere. En una realización, el anticuerpo monoclonal se eluye de la columna Capto™ adhere usando una composición que comprende Bis-tris.

En una realización, al menos tres unidades de volumen de la composición biológica se someten a diafiltración en una unidad de volumen de la composición que comprende PBS. En una realización, al menos cinco unidades de volumen de la composición biológica se someten a diafiltración en una unidad de volumen de la composición que comprende PBS.

En una realización, la composición purificada se somete a diafiltración adicionalmente en una composición que comprende histidina.

Se describe además un método para purificar un anticuerpo monoclonal, que comprende:

(a) hacer pasar una primera composición que comprende el anticuerpo monoclonal a través de una columna de cromatografía por afinidad para obtener una segunda composición que comprende el anticuerpo monoclonal; (b) reducir el pH de la segunda composición para obtener una tercera composición; (c) lavar la tercera composición con un disolvente-detergente para obtener una cuarta composición; (d) lavar la cuarta composición para retirar el disolvente-detergente para obtener una quinta composición; (e) hacer pasar la quinta composición a través de una

columna de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una sexta composición que comprende el anticuerpo monoclonal; (f) someter la sexta composición a nanofiltración para obtener una séptima composición; (g) hacer pasar la séptima composición a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para obtener una octava composición que comprende el anticuerpo monoclonal y Bis-tris; y (h) someter a diafiltración la octava composición en una composición que comprende PBS para obtener una novena composición que comprende el anticuerpo monoclonal pero está sustancialmente libre de Bis-tris.

Se enumeran realizaciones adicionales en las reivindicaciones.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra análisis de HPLC de intercambio catiónico débil de ch14.18 después de la diafiltración con PBS. La línea A representa ch14.18 sometido a diafiltración con PBS. La línea B representa ch14.18 sometido a diafiltración en HBS, ambos monitorizados a 215 nm.

La figura 2 muestra una muestra de Bis-tris 25 mM cargada en la columna de HPLC de intercambio catiónico débil, y demuestra que el pico con un tiempo de retención de ~7 minutos se debe a Bis-tris. La evaluación de Bis-tris 25 mM mediante intercambio catiónico débil. La línea A indica la absorbancia monitorizada a 215 nm. La línea B indica la absorbancia monitorizada a 280 nm.

La figura 3 muestra HPLC catiónica débil de una agrupación de eluatos de Capto™ adhere de resina nueva o usada, y demuestra que el pico a ~7 minutos se debe a Bis-tris y no a algún contaminante en la columna de un uso anterior. Las muestras de agrupaciones de eluatos de Capto™ adhere, sin ch14.18 derivó de columnas de cromatografía nuevas o usadas. La línea A es para la muestra de la nueva columna. La línea B es de la columna usada.

La figura 4 muestra cromatografía HPLC de intercambio catiónico débil de ch14.18, con adiciones conocidas con contaminantes antes de la diafiltración en PBS. La línea A representa ch14.18 sin adiciones conocidas de contaminante. La línea B representa ch14.18 con adiciones conocidas con fosfato de tributilo y polisorbato 80. La línea C representa ch14.18 con adiciones conocidas con metotrexato. Ninguno de los aditivos traza del procedimiento de purificación son responsables del pico a ~7 minutos (figuras 1 y 2).

La figura 5 proporciona un esquema que representa una realización de un diagrama de flujo del procedimiento para purificar anticuerpo monoclonal (ch14.18). Este procedimiento de purificación se desarrolló inicialmente por el National Cancer Institute (NCI) (véase el ejemplo 2) y se mejoró posteriormente por United Therapeutics Corp (véase el ejemplo 1).

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier objeto que se encuentre fuera de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

Muchos aspectos descritos en el presente documento se refieren a un método para purificar una composición biológica, que comprende someter a diafiltración la composición biológica con solución salina tamponada con fosfato (PBS), para obtener una composición purificada.

Composición biológica

Muchas composiciones biológicas conocidas en la técnica pueden purificarse usando los métodos descritos en el presente documento. La composición biológica puede comprender al menos un material creado de manera biológica en lugar de sintetizado químicamente, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, células, tejidos, vacunas y sangre o un componente de los mismos.

La composición biológica puede comprender, por ejemplo, al menos una proteína aislada incluyendo una proteína recombinante. La composición biológica puede comprender, por ejemplo, al menos un ácido nucleico aislado. La composición biológica puede comprender, por ejemplo, al menos un anticuerpo monoclonal. La composición biológica puede comprender, por ejemplo, al menos un anticuerpo quimérico, alterado o humanizado.

En una realización particular, la composición biológica comprende al menos un anticuerpo monoclonal ch14.18, aunque pueden purificarse otros anticuerpos y productos biológicos mediante las enseñanzas divulgadas en el presente documento.

La composición biológica puede comprender, por ejemplo, al menos una impureza. La impureza puede ser, por ejemplo, una sal no deseable tal como Bis-tris. La concentración de la impureza Bis-tris en la composición biológica puede ser, por ejemplo, Bis-tris de 1 a 100 mM o Bis-tris de 10 a 50 mM o Bis-tris de 20 a 40 mM. El pH puede ser, por ejemplo, de 6 a 7, o de 6,3 a 6,7 o de 6,4 a 6,6.

Diafiltración con PBS

5 En algunos aspectos, el método descrito en el presente documento comprende someter a diafiltración al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis unidades de volumen de la composición biológica en una unidad de volumen de PBS.

10 En algunos aspectos, la composición biológica comprende Bis-tris no deseable, y el método descrito en el presente documento comprende retirar al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70%, al menos el 90% o al menos el 95% de Bis-tris de la composición biológica por medio de diafiltración con PBS.

La concentración de PBS puede ser, por ejemplo, fosfato de sodio de 10 a 50 mM y NaCl de 100 a 200 mM.

15 En algunos aspectos, antes de someterse a diafiltración con PBS, la composición biológica se concentra en primer lugar.

En algunos aspectos, después de la diafiltración con PBS, la composición biológica se somete a diafiltración en una formulación que comprende histidina 20 mM, NaCl 150 mM y solución salina de Tween 20 al 0,05% (HBS).

Aislamiento del anticuerpo monoclonal

20 En varios aspectos descritos en el presente documento, el método también comprende aislar y purificar el anticuerpo monoclonal antes de la diafiltración con PBS. El anticuerpo monoclonal puede aislarse y purificarse mediante, por ejemplo, al menos una columna de cromatografía. El anticuerpo monoclonal puede aislarse y purificarse mediante, por ejemplo, al menos una columna de cromatografía por afinidad, al menos una columna de cromatografía de intercambio catiónico y/o al menos una columna de cromatografía de intercambio aniónico. La columna de cromatografía de intercambio aniónico puede ser, por ejemplo, una columna Capto™ adhere.

25 La columna Capto™ adhere se conoce en la técnica y uno comercialmente disponible de GE Healthcare Life Sciences. Es un medio multimodal para purificación intermedia y pulido de anticuerpos monoclonales después de la captura en medio de proteína A mediante cromatografía de lecho rellena. Algunos aspectos descritos en el presente documento comprenden purificar un anticuerpo monoclonal usando columna Capto™ adhere, en los que el anticuerpo monoclonal se eluye con una composición que comprende tampón Bis-tris. La formulación de anticuerpo eluido debe entonces someterse a diafiltración en una formulación que comprende PBS, tal como se comentó anteriormente, y opcionalmente someterse a diafiltración adicionalmente en una formulación que comprende HBS.

30 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, concentrar la composición biológica que comprende anticuerpo monoclonal recogido.

35 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, someter a diafiltración la composición biológica en tampón de equilibrio de proteína A. En un aspecto particular, el tampón de equilibrio de proteína A comprende fosfato de sodio de 25 a 100 mM, NaCl de 0,5 a 2,0 M, con pH de 7,0 a 8,0.

40 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, hacer pasar la composición biológica a través de una columna de cromatografía por afinidad, tal como una columna de afinidad de proteína A.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, inactivación viral reduciendo el pH de la composición biológica.

45 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, inactivación viral lavando la composición biológica con un disolvente-detergente. En un aspecto particular, el disolvente-detergente comprende del 10 al 25% de polisorbato (TWEEN), del 5 al 10% de fosfato de tributilo.

50 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, lavar la composición biológica para retirar cualquier disolvente-detergente.

55 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, someter a diafiltración la composición biológica en tampón de equilibrio de 50HS. En un aspecto particular, el tampón de equilibrio 50HS comprende citrato de 5 a 20 mM, fosfato de 5 a 30 mM, cloruro de sodio de 15 a 100 mM, con pH de 4,0 a 5,5.

60 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, hacer pasar la composición biológica a través de una columna de cromatografía por afinidad de intercambio catiónico tal como una columna 50HS.

65 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, someter la composición biológica a nanofiltración.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, hacer pasar la composición biológica a través de una columna de cromatografía por afinidad de intercambio aniónico, tal como una columna Capto™ adhere antes de la diafiltración con PBS. El anticuerpo monoclonal puede eluirse de la columna Capto™ adhere usando un tampón Bis-tris.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, además, por ejemplo, someter a diafiltración la composición biológica en un tampón de histidina después de la diafiltración con PBS.

En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden las siguientes etapas:

(a) hacer pasar una primera composición que comprende el anticuerpo monoclonal a través de una columna de cromatografía por afinidad para obtener una segunda composición que comprende el anticuerpo monoclonal;

(b) reducir el pH de la segunda composición para obtener una tercera composición;

(c) lavar la tercera composición con un disolvente-detergente para obtener una cuarta composición;

(d) lavar la cuarta composición para retirar el disolvente-detergente para obtener una quinta composición;

(e) hacer pasar la quinta composición a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una sexta composición que comprende el anticuerpo monoclonal;

(f) someter la sexta composición a nanofiltración para obtener una séptima composición;

(g) hacer pasar la séptima composición a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para obtener una octava composición que comprende el anticuerpo monoclonal y Bis-tris; y

(h) someter a diafiltración la octava composición en una composición que comprende PBS para obtener una novena composición que comprende el anticuerpo monoclonal pero está sustancialmente libre de Bis-tris.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1 - Desarrollo de ensayo de HPLC de intercambio catiónico débil

En el desarrollo del procedimiento de purificación de ch14.18, un objetivo era mejorar el procedimiento de purificación que se desarrolló inicialmente por el National Cancer Institute (NCI) (véase la figura 5 para el procedimiento inicialmente desarrollado por el NCI). Un objetivo adicional era mejorar a resinas de cromatografía que tenían mejor capacidad, mejores propiedades de flujo, o eran tolerantes a productos químicos más agresivos que podrían ser útiles para esterilizar las resinas antes del siguiente uso (por ejemplo, resina Capto™ adhere de GE Healthcare).

Para las dos últimas etapas de cromatografía (véanse las secciones 18 y 19 de la figura 5), NCI usó una columna de cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 para retirar agregados y dímeros de ch14.18, seguido por una resina de intercambio aniónico Q Sepharose como resina de pulido. Se mejoraron a una resina que retira virus, agregados y contaminantes traza, la resina Capto™ adhere de GE Healthcare (véase, por ejemplo, GE Healthcare Life Sciences, Instrucciones 28-9064-05 manual de producto de cromatografía por afinidad Capto™ adhere, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y está disponible en https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28906405_20120420104439.pdf). Esta resina es una resina de modo mixto, una combinación de intercambio aniónico e interacción hidrófoba. Se operó en el modo de flujo a través, en el que los contaminantes se unen a la resina, mientras que el anticuerpo monoclonal ch14.18 no se unió y permaneció en el flujo a través.

Al mismo tiempo que se revisaba la purificación de ch14.18, también estaban desarrollándose ensayos indicadores de calidad. Uno de estos era un ensayo de cromatografía HPLC de intercambio catiónico débil. Para esto, la columna TSKGEL CM-3SW de TOSOH se usó para evaluar la pureza de ch14.18. Para este análisis, el anticuerpo unido a la columna y eluido de la columna como un gradiente de sal se ejecutó a través de la columna. La columna se equilibró en un tampón fosfato de sodio de bajo contenido en sal (tampón A) y el gradiente se generó con una concentración aumentada de tampón fosfato de sodio/perclorato de sodio (tampón B). Con este método de separación se monitorizó el efluente de la columna a 215nm y el pico de ch14.18 eluido de la columna a aproximadamente 15-19 minutos después de la inyección. El tiempo de retención para ch14.18 varió según se optimizaban el método y el gradiente. Durante el desarrollo del ensayo, diversas muestras de ch14.18 se sometieron a prueba y en algunas de ellas se observó un pico bastante grande, que tenía un tiempo de retención de ~7,5 minutos. Al intentar identificar este contaminante, a las muestras de ch14.18 se le añadieron adiciones conocidas con contaminantes que se añaden pronto en el procedimiento de fabricación (véase la figura 1). A una muestra de ch14.18 que no contenía el contaminante se le añadieron adiciones conocidas con metotrexato o fosfato de tributilo y polisorbato 80. Ninguno de estos contaminantes parecía ser la fuente del pico con el tiempo de retención de 7,5 minutos.

5 A través del seguimiento de la fuente de las muestras y qué etapa en el procedimiento de purificación se derivó la muestra, se indicó que el pico en cuestión sólo se observaba después de cromatografía con Capto™ adhere, que era la etapa de pulido final en el procedimiento de purificación. Se sospechó que el contaminante era algún contaminante traza, tal como proteína de la célula huésped del procedimiento de cultivo celular que se estaba purificando conjuntamente y concentrando en la columna. Las muestras de series simuladas en una columna Capto™ adhere que se habían cargado en una columna usada o una columna nueva se evaluaron mediante cromatografía HPLC de intercambio catiónico débil (véase la figura 2). El pico del contaminante a los 7,5 minutos se encontró en ambas muestras a aproximadamente la misma concentración, lo que indica que el contaminante no se derivaba de contaminantes aguas arriba.

10 A través del seguimiento del origen de las muestras de ch14.18 que contenía las muestras y aquellas que no, resultó evidente que el contaminante era Bis-tris que es la sal tampón usada para la etapa de purificación con Capto™ adhere (véase la figura 3).

15 Habiendo identificado el contaminante, se investigó después el motivo de que algunas de las muestras de ch14.18 purificadas, que habían pasado por todo el procedimiento de purificación, contenían pico de Bis-tris, mientras que otras no. Además, se desarrolla una formulación de anticuerpo final en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, solución salina de Tween 20 al 0,05% (HBS), que se convirtió a partir de una formulación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) usada por NCI. Se indicó que si la agrupación de producto de Capto™ adhere que contenía ch14.18 se sometía a diafiltración directamente en el tampón HBS, el pico de Bis-tris no se eliminó por diafiltración de la agrupación del retenido. Sin embargo, si esta agrupación se sometió a diafiltración en primer lugar en solución salina tamponada con fosfato y luego en el tampón HBS, Bis-tris se retiró completamente de la disolución. La figura 4 muestra ch14.18 de la etapa de cromatografía con Capto™ adhere que se había sometido a diafiltración en HBS o se había sometido a diafiltración con PBS.

20 En conclusión, la columna Capto™ adhere se usa comúnmente en la industria de biotecnología para la purificación de anticuerpos monoclonales. Tiene utilidad para la retirada de contaminantes traza tales como ligando de proteína A residual, ADN de célula huésped residual, proteínas de células huésped residuales, agregados de anticuerpo y virus. La diafiltración con PBS demostró ser una manera eficaz de retirar las impurezas de Bis-tris antes de la formulación final de un anticuerpo monoclonal tal como ch14.18.

Ejemplo 2 – Diagrama de flujo del procedimiento

35 Se proporciona un diagrama de flujo del procedimiento en la figura 5, que representa una realización para purificar un anticuerpo monoclonal (Ch14.18). El procedimiento representado no se pretende que esté limitado estrictamente y puede ajustarse según las necesidades y circunstancias particulares del procedimiento disponible. El procedimiento de la figura 5 generalmente se refiere a las siguientes etapas:

40 Sección 8. Agrupación inicial y filtración de material recogido del anticuerpo monoclonal (por ejemplo, material recogido en bruto).

45 Sección 9. Hacer pasar los materiales recogidos de la sección 8 a través de una columna de cromatografía por afinidad (por ejemplo, una columna de cromatografía de proteína A) para obtener una segunda composición que comprende el anticuerpo monoclonal.

50 Sección 10. Inactivar virus reduciendo el pH de la segunda composición para obtener una tercera composición. la tercera composición se lava entonces con un disolvente-detergente para obtener una cuarta composición, que se lava luego de nuevo para retirar el disolvente-detergente para obtener una quinta composición.

55 Sección 11. Hacer pasar la quinta composición a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía SP Sepharose FF) para obtener una sexta composición que comprende el anticuerpo monoclonal. La cromatografía de proteína A puede repetirse (sección 12), seguido de una repetición de la inactivación viral (Sección 13), seguido de una repetición de la cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, Sepharose) (sección 14). Las series de Sepharose se agrupan entonces para formar la sexta composición.

Sección 16. Someter la sexta composición a nanofiltración para retirar adicionalmente virus para obtener una séptima composición.

60 Secciones 17, 18, 19. Concentrar el anticuerpo monoclonal haciendo pasar la séptima composición a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 para retirar agregados y dímeros del anticuerpo monoclonal. La composición se hace pasar entonces a través de una resina de intercambio aniónico Q Sepharose para obtener una octava composición que comprende el anticuerpo monoclonal.

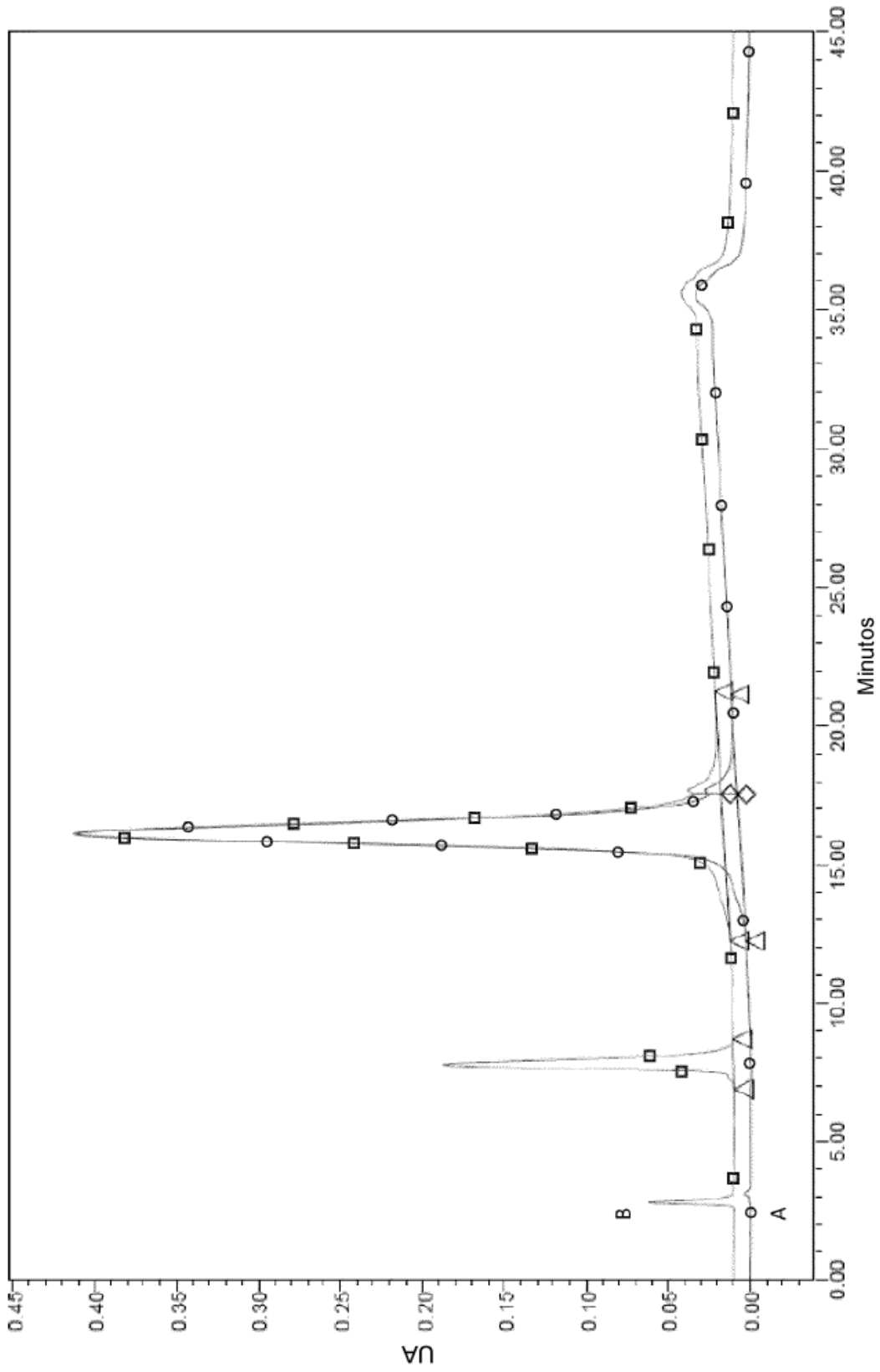
65 Sección 20. Concentración y filtración final. La octava composición se somete entonces a concentración y filtración final, incluyendo diafiltración en una composición que comprende PBS, para obtener una novena composición que

comprende el anticuerpo monoclonal.

REIVINDICACIONES

1. Método para purificar una composición biológica, que comprende someter a diafiltración la composición biológica con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para obtener una composición purificada, en el que la composición biológica comprende un anticuerpo monoclonal ch14.18.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la composición biológica antes de la purificación comprende bis(2-hidroxietyl)amino-tris(hidroxietyl)metano (Bis-tris).
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 es una proteína aislada.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 se concentra hasta una concentración de al menos 2,0 a 5,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS; o en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 se concentra hasta una concentración de al menos 4,0 a 6,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS.
5. Método según la reivindicación 1, en el que la composición biológica comprende además al menos una impureza, preferiblemente en el que la impureza es bis(2-hidroxietyl)aminotris(hidroxietyl)metano (Bis-tris).
6. Método según la reivindicación 2 ó 5, en el que la concentración de Bis-tris en la composición biológica es Bis-tris de 10 a 50 mM a un pH de 6,3 a 6,7; en el que la diafiltración retira al menos el 50% de Bis-tris de la composición biológica; o en el que la diafiltración retira al menos el 70% de Bis-tris de la composición biológica.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración de PBS es fosfato de sodio de 10 a 50 mM y NaCl de 100 a 200 mM.
8. Método según la reivindicación 1, que comprende además aislar y purificar el anticuerpo monoclonal ch14.18 usando al menos una columna de cromatografía, que comprende preferiblemente aislar y purificar el anticuerpo monoclonal ch14.18 usando al menos una columna de cromatografía por afinidad, al menos una columna de cromatografía de intercambio catiónico y/o al menos una columna de cromatografía de intercambio aniónico, más preferiblemente en el que la columna de intercambio aniónico es una columna Capto TM adhere, y lo más preferiblemente en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 se eluye de la columna Capto TM adhere usando una composición que comprende Bis-tris.
9. Método según la reivindicación 1, en el que al menos tres o al menos cinco unidades de volumen de la composición biológica se someten a diafiltración en una unidad de volumen de la composición que comprende PBS.
10. Método según la reivindicación 1, en el que la composición purificada se somete a diafiltración adicionalmente en una composición que comprende histidina.
11. Método para purificar un anticuerpo monoclonal, que comprende:
 - (a) hacer pasar una primera composición que comprende el anticuerpo monoclonal a través de una columna de cromatografía por afinidad para obtener una segunda composición que comprende el anticuerpo monoclonal;
 - (b) reducir el pH de la segunda composición para obtener una tercera composición;
 - (c) lavar la tercera composición con un disolvente-detergente para obtener una cuarta composición;
 - (d) lavar la cuarta composición para retirar el disolvente-detergente para obtener una quinta composición;
 - (e) hacer pasar la quinta composición a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico para obtener una sexta composición que comprende el anticuerpo monoclonal;
 - (f) someter la sexta composición a nanofiltración para obtener una séptima composición;
 - (g) hacer pasar la séptima composición a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para obtener una octava composición que comprende el anticuerpo monoclonal y Bis-tris; y
 - (h) someter a diafiltración la octava composición en una composición que comprende PBS para obtener una novena composición que comprende el anticuerpo monoclonal pero está sustancialmente libre de Bis-tris.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal ch14.18.
- 5 13. Método según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 se concentra hasta una concentración de al menos 2,0 a 5,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS, o en el que el anticuerpo monoclonal ch14.18 se concentra hasta una concentración de al menos 4,0 a 6,0 UA antes de someterse a diafiltración en la composición que comprende PBS.
- 10 14. Método para purificar una composición biológica que comprende bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (bis-tris) para retirar bis-tris, que comprende someter a diafiltración la composición biológica con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para obtener una composición purificada, en el que la diafiltración retira al menos el 50% de bis-tris de la composición biológica, en el que la composición biológica comprende un anticuerpo monoclonal ch14.18.
- 15 15. Método para retirar bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (bis-tris) de una composición biológica que comprende un anticuerpo monoclonal ch14.18, que comprende someter a diafiltración la composición biológica con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para retirar al menos el 50% de bis-tris de la composición biológica.



A —○— Nombre de muestra: 7504 PBS 1:3.5 mg/ml; Fecha adquirido: 4/5/2011 2:56:46 PM EDT; Vial: 31; Inyección: 1
B —□— Nombre de muestra: 7504 en HBS; Fecha adquirido: 4/5/2011 4:28:46 PM EDT; Vial: 36; Inyección: 1

FIGURA 1

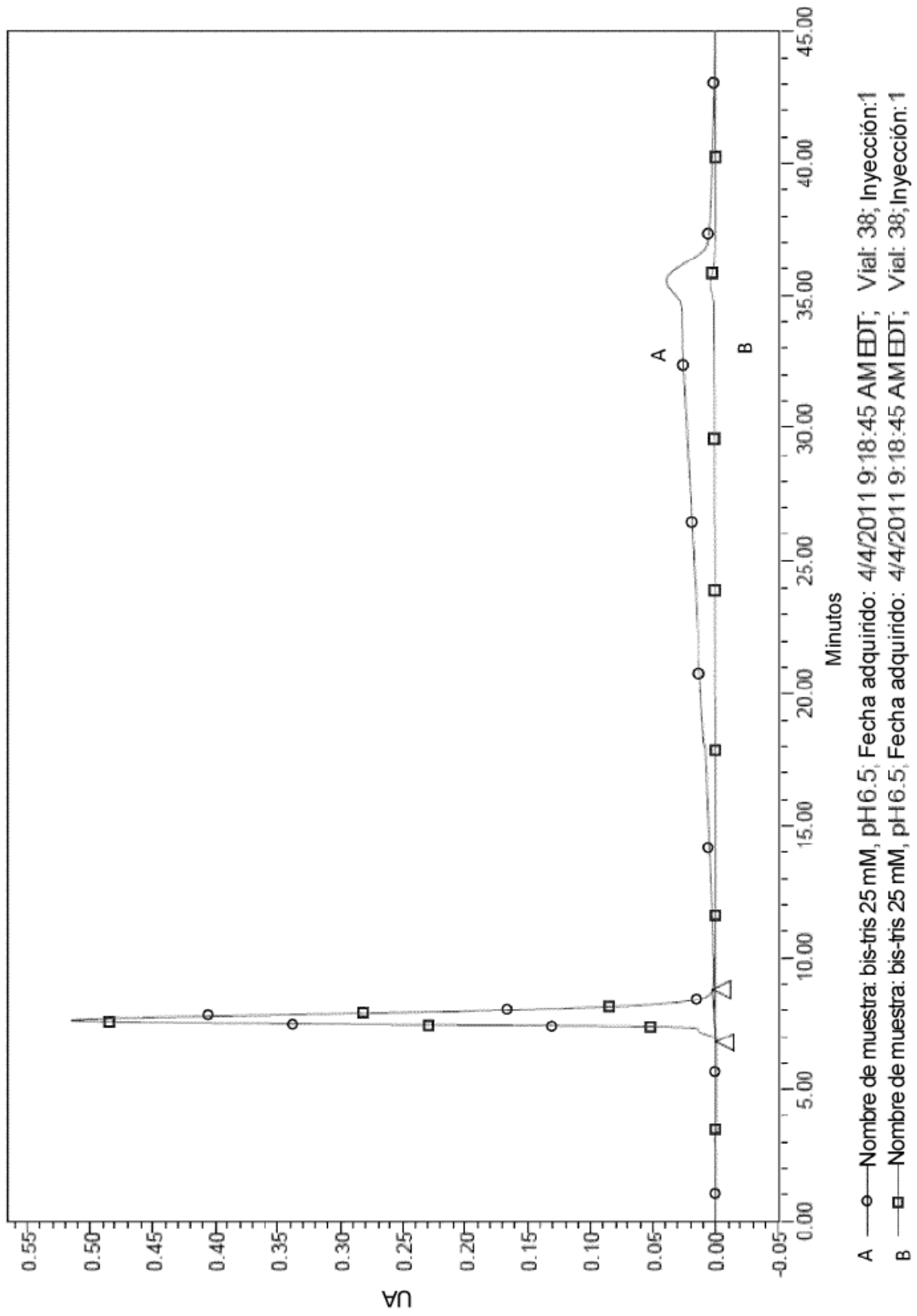


FIGURA 2

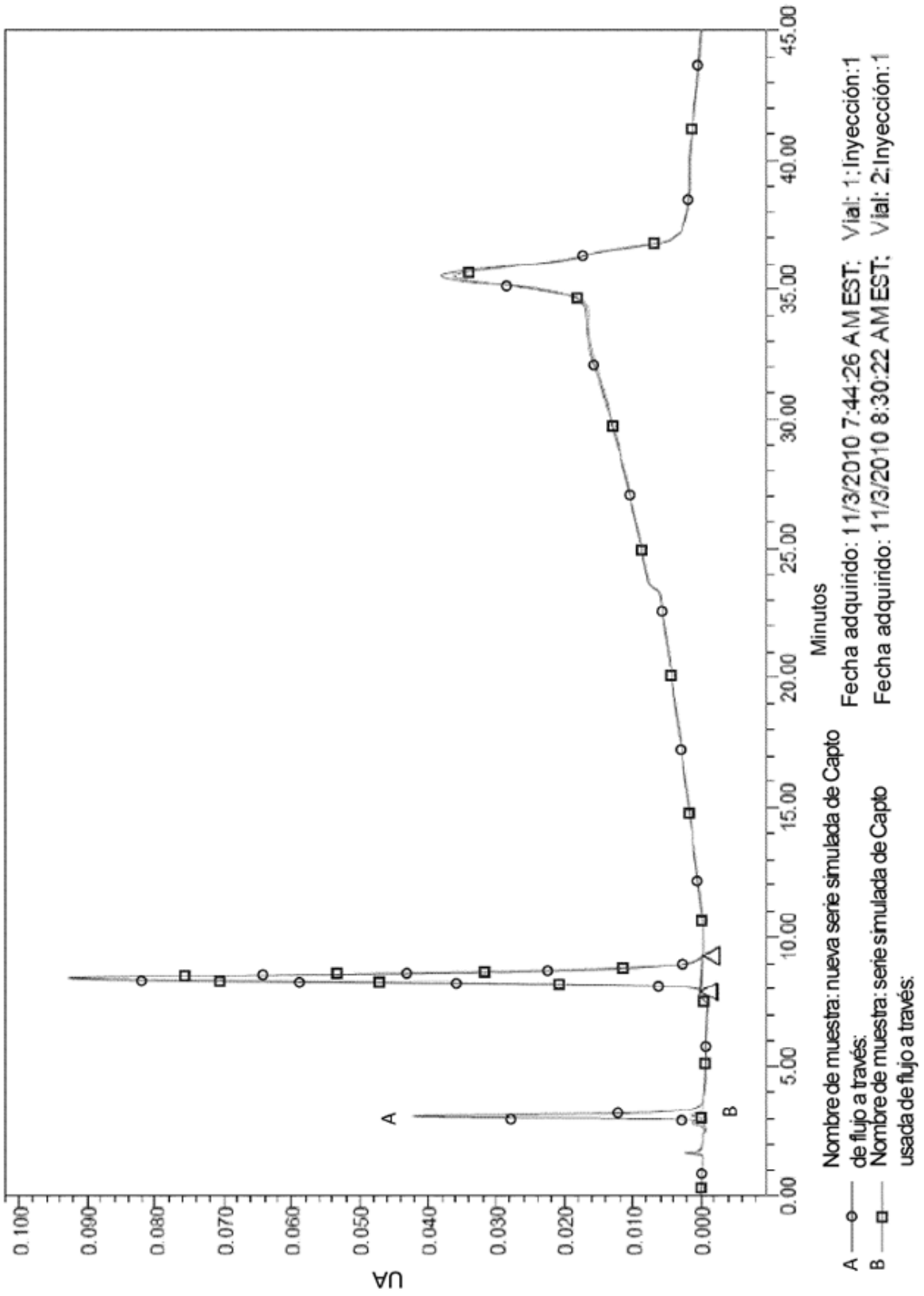


FIGURA 3

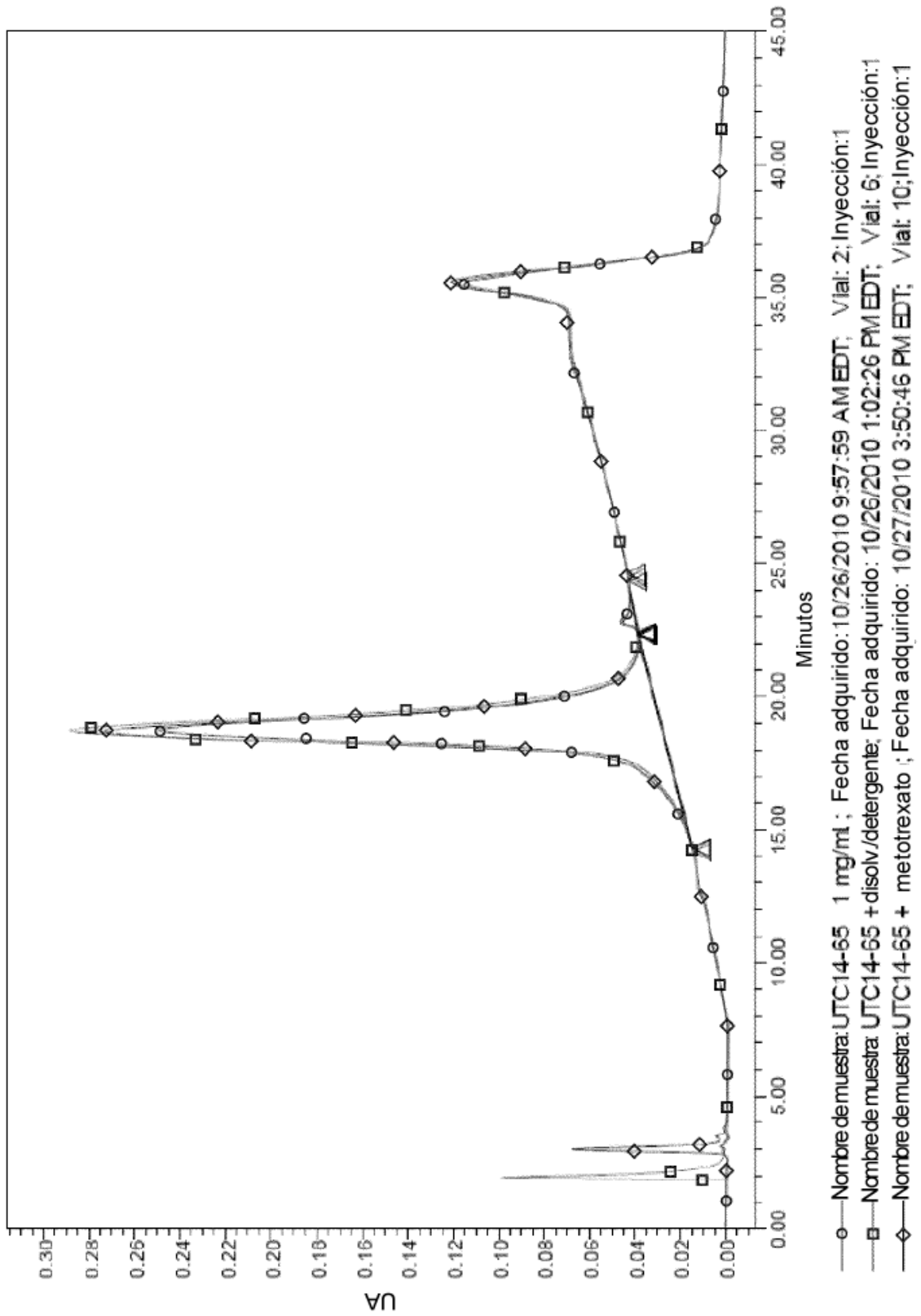


FIGURA 4

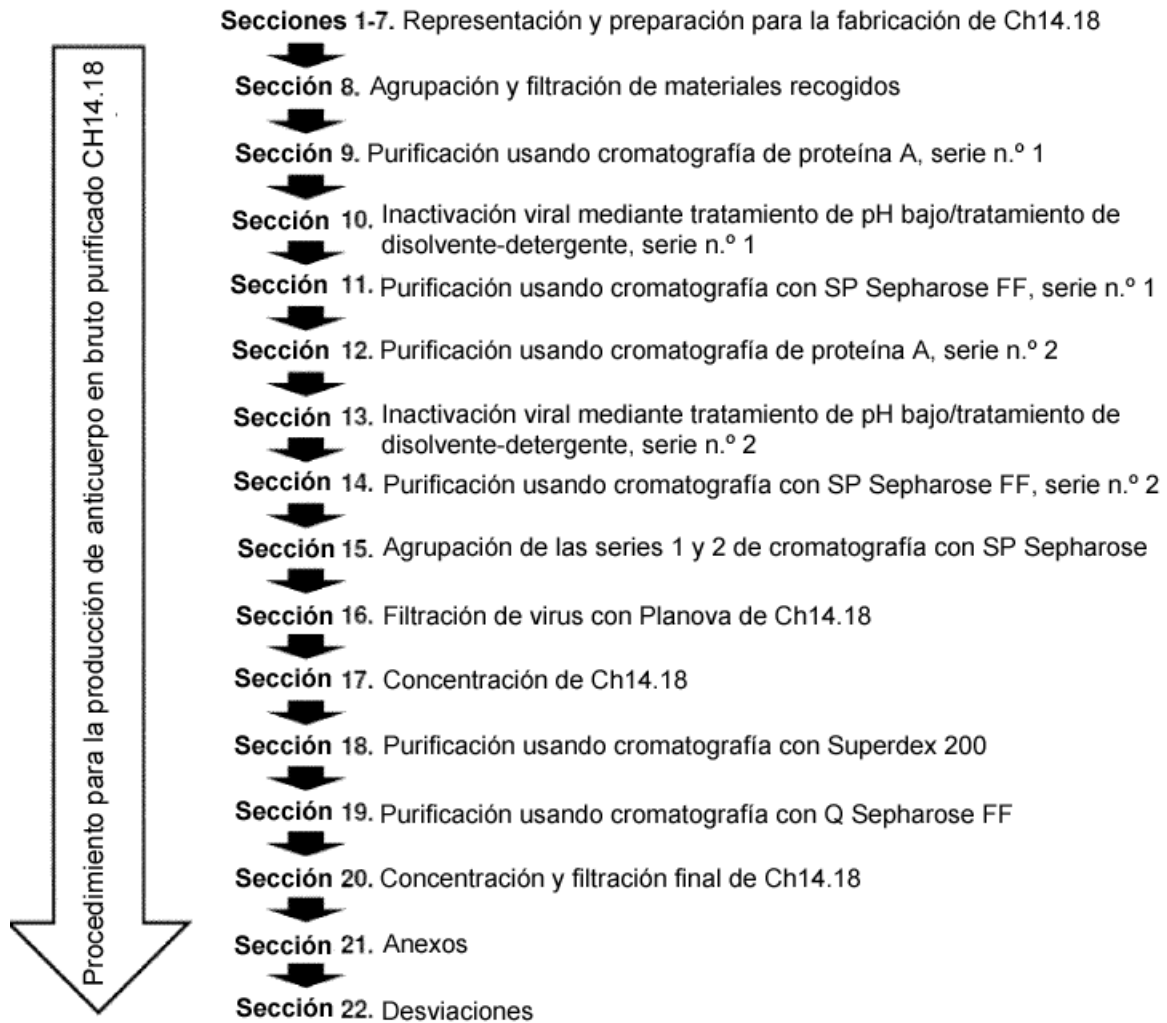


FIGURA 5