



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 122020007658-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 06/10/2004**

**(45) Data de Concessão: 27/07/2021**

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA A REMOÇÃO DE AGREGADOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE HIDROXIAPATITA

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/06; B01D 15/08.

**(30) Prioridade Unionista:** 20/11/2003 US 60/523,335; 27/10/2003 US 60/514,018.

**(73) Titular(es):** WYETH.

**(72) Inventor(es):** SHUJUN SUN; CHRISTOPHER GALLO; BRIAN KELLEY.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2004032883 de 06/10/2004

**(87) Publicação PCT:** WO 2005/044856 de 19/05/2005

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 16/04/2020

**(62) Pedido Original do Dividido:** PI0415887-3 - 06/10/2004

**(57) Resumo:** Esta invenção refere-se à aplicação de cromatografia de hidroxiapatita à purificação de pelo menos um anticorpo a partir de uma preparação contendo agregados de elevado peso molecular. Além disso, esta invenção refere-se a uma integração de cromatografia de hidroxiapatita cerâmica em um protocolo cromatográfico de combinação para a remoção de agregados de elevado peso molecular a partir de uma preparação de anticorpos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA A REMOÇÃO DE AGREGADOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE HIDROXIAPATITA**".

Dividido do PI0415887-3, depositado em 06.10.2004.

[1] Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao pedido de patente provisório US no. 60/ 523 335, depositado em 20 de novembro de 2003, e pedido de patente provisório US no. 60/ 514 018, depositado em 27 de outubro de 2003, cujas descrições são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

[2] A presente invenção refere-se aos métodos de remoção de agregados de elevado peso molecular de uma preparação de anticorpos usando cromatografia de hidroxiapatita. Em algumas modalidades da invenção, a quantidade de agregados de elevado peso molecular presente na preparação final pode ser reduzida de modo significativo, como de 40% a menos de 1%.

Antecedentes da Invenção

[3] É desejável identificar os métodos utilizáveis de purificação de proteínas que não destroem, ou reduzem de modo significativo, a atividade biológica da proteína. Os contaminantes devem ser removidos das preparações de anticorpos antes delas serem usadas em aplicações diagnósticas, aplicações terapêuticas, biologia de células aplicada e estudos funcionais. As preparações de anticorpos coletados de linhas de células de hibridoma, por exemplo, com freqüência contém componentes indesejáveis, como agregados de elevado peso molecular (HMWA) do anticorpo produzido por linha de célula. Esta formação de agregados pode afetar de modo adverso a segurança do produto ao causar uma ativação complementar ou anafilaxia quando da administração. Além disso, a formação de agregados pode impedir os pro-

cessos de fabricação ao causar um rendimento de produto diminuído, ampliação do pico e perda de atividade.

[4] Os métodos de purificação de proteínas mais comuns são atribuídos em diferenças de tamanhos, carga, e solubilidade entre a proteína a ser purificada e os contaminantes. Os protocolos com base nestes parâmetros incluem cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de interação hidrofóbica. Estes métodos cromatográficos, no entanto, às vezes apresentam dificuldades técnicas na separação de espécies agregadas ou multiméricas de anticorpos. As técnicas como cromatografia de troca iônica ou de interação hidrofóbica, por exemplo, podem induzir a formação de agregados devido à aumentada concentração de proteínas ou as mudanças requeridas em concentração de tampão e/ou pH durante a eluição. Além disso, em vários casos, os anticorpos mostram diferenças em pontos isoelétricos que são muito pequenas para permitir sua separação por cromatografia de troca iônica. Tarditi, J. *Immunol. Methods*. 599: 13-20 (1992). A cromatografia de exclusão de tamanho é volumosa e resulta na diluição significativa do produto, o que é um impedimento nos processos de fabricação com base em eficiência e larga escala. O vazamento de ligantes das colunas de cromatografia de afinidade também pode ocorrer, o que resulta em contaminação indesejável do produto eluído. Steindl, J. *Immunol. Methods*, 235: 61-69 (2000). Os requerentes tentaram remover HMWA de uma preparação de anticorpo anti-GDF-8 usando cromatografia de troca aniônica, cromatografia de troca catiônica, assim como cromatografia de interação hidrofóbica. No entanto, todos estes métodos foram incapazes de remover substancialmente os HMWA da preparação de anticorpos anti-GDF-8.

[5] A cromatografia de hidroxapatita é um método de purificação de proteínas que usa um fosfato de cálcio hidroxilado insolúvel

[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>], que forma tanto a matriz como o ligante. Os grupos funcionais consistem em pares de íons cálcio positivamente carregados (sítios C) e agrupamentos de grupos fosfato negativamente carregados (sítios P). As interações entre hidroxiapatita e proteínas são complexas e multimodais. Em um método de interação, no entanto, os grupos amino positivamente carregados em proteínas se associam com os sítios P negativamente carregados e grupos carboxila de proteína interagem por complexação de coordenação a sítios C. Shepard. *J. of Chromatography* 891: 93- 98 (2000).

[6] A hidroxiapatita cristalina foi o primeiro tipo de hidroxiapatita usada em cromatografia, mas foi limitada por dificuldades estruturais. A cromatografia de hidroxiapatita cerâmica (cHA) foi desenvolvida para superar algumas das dificuldades associadas com a hidroxiapatita cristalina, como as taxas de fluxo limitadas. A hidroxiapatita cerâmica tem uma elevada durabilidade, boa capacidade de ligação a proteína, e pode ser usada em maiores taxas de fluxo e pressões do que a hidroxiapatita cerâmica. Vola et al, *BioTechniques*, 14: 650- 655 (1993).

[7] A hidroxiapatita tem sido usada na separação cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, assim como anticorpos. Em cromatografia de hidroxiapatita, a coluna é normalmente equilibrada, e a amostra aplicada, em uma baixa concentração de tampão fosfato e as proteínas adsorvidas são então eluídas em um gradiente de concentração de tampão fosfato. Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 522- 529 (2000). Às vezes, gradientes rasos de fosfato de sódio são usados com sucesso para eluir proteínas, enquanto em outros casos, os gradientes de concentração de até 400 mM de fosfato de sódio foram usados com sucesso. Ver, por exemplo, Stanker, *J. Immunological Methods* 76: 157- 169 (1985) (10 mM a 30 mM gradiente de eluição de fosfato de sódio); Shepard *J. Chromatography* 891: 93- 98 (2000) (10 mM a 74 mM gradiente de eluição de fosfato de sódio).

Tarditi, J. *Chromatography* 599: 13-20 (1992) (10 mM a 350 mM gradiente de eluição de fosfato de sódio). Apesar de sais como NaCl terem sido incorporados no tampão de ligação para purificar um anticorpo usando cromatografia de hidroxiapatita, Giovannini, R. *Biotechnology and Bioengineering* 73: 522- 529 (2000), sais como NaCl e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  não são conhecidos como afetando a eluição de proteínas em cromatografia de hidroxiapatita. Karlsson et al, *Ion Exchange Chromatography*, in *Protein Purification*, VCH Publishers, Inc. (Janson e Ryden ed. 1989).

[8] Em vários casos, pesquisadores são incapazes de eluir seletivamente anticorpos a partir de hidroxiapatita ou verificaram que a cromatografia de hidroxiapatita não resulta em um produto suficientemente puro. Junbauer J. *Chromatography*, 476:257-268 (1989), Giovannini *Biotechnology and Bioengineering* 73: 522- 529 (2000). Os requerentes tentaram sem sucesso separar agregados de elevado peso molecular de uma preparação de anticorpos usando cromatografia de hidroxiapatita e uma eluição de fosfato de sódio à base em ensinamentos da técnica anterior (figura 1). Além disso, as condições de eluição severas, quando usadas em uma tentativa para romper a ligação firme de uma proteína em uma matriz, são conhecidas como destruindo a atividade biológica de uma proteína. Assim, existe a necessidade de métodos eficazes para remover impurezas, como agregados de elevado peso molecular, de preparações de anticorpos, que não destruam a atividade biológica dos anticorpos.

#### Sumário da Invenção

[9] Os requerentes verificaram de modo surpreendente que NaCl pode ser usado em um novo método de cromatografia de hidroxiapatita para a purificação de imunoglobulinas e remoção de HMWA de diferentes matérias-primas (figura 2). Assim, a presente invenção refere-se a métodos de remoção de agregados de elevado peso mole-

cular de preparações de anticorpos por contato da referida preparação com resina de hidroxiapatita e eluição seletiva do anticorpo a partir da resina. Alternativamente, a preparação de anticorpos pode ser trocada em tampão em um tampão de equilíbrio e então deixada fluir através da resina de hidroxiapatita. Uma combinação destes métodos de ligação / cromatografia de hidroxiapatita com fluxo transpassante também podem ser usada para purificar as preparações de anticorpos.

[10] A invenção refere-se a um tampão de eluição ou tampão de carga que contém de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0,2 a 2,5 M de NaCl, em que o tampão de eluição ou tampão de carga tem um pH de 6,4 a 7,6.

[11] Em um modo de combinação ligação /fluxo transpassante, a invenção refere-se a um tampão de equilíbrio e tampão de lavagem que contém de 1 a 20 mM de fosfato de sódio, de 0,01 a 2,0 M de NaCl, de 0 a 200 mM arginina, e de 0 a 200 mM HEPES, em que o tampão de equilíbrio e tampão de lavagem tem um pH de 6,2 a 8,0.

[12] Em uma modalidade, o anticorpo purificado contém menos que 5% de agregados de elevado peso molecular.

[13] Em uma outra modalidade, o anticorpo purificado contém menos que 1% de agregados de elevado peso molecular.

[14] Em uma modalidade adicional, a preparação de anticorpos contém pelo menos um anticorpo IgG. Mais especificamente, a preparação de anticorpos contém pelo menos um anticorpo escolhido dentre receptor anti-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, ou anti-IL-22.

[15] Pelo menos um método de purificação pode ser usado em combinação com a cromatografia de hidroxiapatita da invenção. Uma variedade de métodos de purificação pode ser usada, incluindo, mas não limitada a cromatografia de Proteína A, cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade

de metal imobilizado, cromatografia de exclusão de tamanho, diafiltração, ultrafiltração, filtração com remoção viral, cromatografia de troca aniônica, e/ou cromatografia de troca catiônica.

[16] Em uma modalidade, as cromatografias de troca aniônica e Proteína A são usadas em combinação com cromatografia de hidroxapatita cerâmica. As cromatografias de troca aniônica e Proteína A podem ser usadas em combinação, por exemplo, contatando a preparação de anticorpos com um suporte de Proteína A, deixando o anticorpo adsorver no suporte, lavando o suporte e o anticorpo adsorvido com pelo menos um tampão de lavagem de Proteína A, eluindo o anticorpo adsorvido, com pelo menos um tampão de eluição de Proteína A, contatando a preparação com um suporte de troca iônica, deixando o anticorpo fluir através do suporte, lavando o suporte com pelo menos um tampão de lavagem de troca iônica, contatando o fluxo transpassante de troca iônica com uma resina de hidroxapatita, deixando o fluxo transpassante adsorver na resina, lavando a resina com pelo menos um tampão de lavagem de hidroxapatita, e eluindo o anticorpo purificado da resina com pelo menos um tampão de eluição de hidroxapatita.

[17] Em outra modalidade, as cromatografias de troca aniônica e Proteína A podem ser usadas em combinação, por exemplo, contatando a preparação com um suporte de Proteína A, deixando o anticorpo adsorver no suporte de Proteína A, lavando o suporte de Proteína A e anticorpo adsorvido com pelo menos um tampão de lavagem de Proteína A, eluindo o anticorpo adsorvido, com pelo menos um tampão de eluição de Proteína A, contatando o eluente de Proteína A com um suporte de troca iônica, deixando o anticorpo fluir através do suporte de troca iônica, lavando o suporte de troca iônica com pelo menos um tampão de lavagem de troca iônica, trocando o fluxo transpassante de troca iônica em um tampão de carga compreendendo de

1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0,2 a 2,5 M de NaCl, contatando o fluxo transpassante de troca iônica com uma resina de hidroxiapatita, deixando o anticorpo fluir através da resina de hidroxiapatita, e lavando a resina de hidroxiapatita com pelo menos um tampão de lavagem de hidroxiapatita.

[18] Em ainda outra modalidade, as cromatografias de troca aniônica e Proteína A são usadas em combinação com cromatografia de hidroxiapatita cerâmica. As cromatografias de troca aniônica e Proteína A podem ser usadas em combinação, por exemplo, por contato da preparação de anticorpos com um suporte de Proteína A, deixando o anticorpo adsorver no suporte, lavando o suporte e anticorpo adsorvido com pelo menos um tampão de lavagem de Proteína A, eluindo o anticorpo adsorvido com pelo menos um tampão de eluição de Proteína A, contatando a preparação com um suporte de troca iônica, deixando o anticorpo fluir através do suporte, lavando o suporte com pelo menos um tampão de lavagem de troca iônica, contatando o fluxo transpassante de troca iônica com uma resina de hidroxiapatita, deixando o fluxo transpassante adsorver na resina, deixando a ligação dos HMWA mais firmemente do que o monômero de anticorpo, e, como a carga continua, deslocamento do monômero ligado pelos HMWA, lavando a resina de hidroxiapatita com pelo menos um tampão de lavagem de hidroxiapatita e coletando o monômero de anticorpo deslocado.

[19] Os objetos adicionais e vantagens da invenção serão especificado sem parte na descrição que se segue, e em parte serão óbvios da descrição, ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os objetos e vantagens da invenção serão realizados e atingidos por meio dos elementos e combinações particularmente apontados nas reivindicações anexas.

[20] Deve-se entender que tanto a descrição geral acima como

a descrição detalhada seguinte são exemplares e explicativos apenas e não limitativos da invenção, como reivindicada.

[21] Os desenhos anexos, que são incorporados e constituem parte deste relatório, e junto com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[22] A figura 1 demonstra a incapacidade da eluição de gradiente fosfato da técnica anterior de separar HMWA de uma preparação de anticorpo anti GDF-8.

[23] A figura 2 demonstra que o uso de eluição de gradiente de NaCl resulta na separação de uma porção grande do HMWA de uma preparação de anticorpo anti-GDF-8.

[24] A figura 3 mostra a separação de HMWA de uma preparação de anticorpo anti-CD22 usando cromatografia de cHA.

[25] A figura 4 mostra a separação de HMWA de uma preparação de anticorpo anti-Abeta usando cromatografia de cHA.

#### Descrição Detalhada da Invenção

##### **Definições**

[26] A fim de que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, alguns termos são primeiro definidos. As definições adicionais são especificadas em toda a descrição detalhada.

[27] O termo "anticorpo" se refere a qualquer imunoglobulina ou fragmento da mesma, e engloba qualquer polipeptídeo compreendendo um sítio de ligação a antígeno. O termo inclui, mas não é limitado a anticorpos policlonais, monoclonais, monoespecíficos, poliespecíficos, não específicos, humanizados, humanos, cadeia única, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mudados, enxertados, e gerados *in vitro*. O termo "anticorpo" também inclui fragmentos de anticorpo como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, dAb, e outros fragmentos de anticorpos que retém a função de ligação a antígeno. Tipicamente, estes fra-

gmentos devem compreender um domínio de ligação a antígeno.

[28] Os anticorpos que podem ser também purificados pela invenção incluem formas quimicamente modificadas como por tratamento PEG, e proteínas de fusão compreendendo uma porção de imunoglobulina. O anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser selecionado dentre qualquer um dos isótipos de anticorpos conhecidos e suas conformações, por exemplo monômeros IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, dímeros IgA, trímeros IgA, ou pentâmeros IgM.

[29] O termo "preparação de anticorpos" refere-se a qualquer composição contendo um anticorpo e/ou componentes indesejados, como agregados de elevado peso molecular destes anticorpos.

[30] "Hidroxiapatita cerâmica" ou "cHA" refere-se a um fosfato de cálcio hidroxilado insolúvel de fórmula  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , que foi sinterizado em temperaturas elevadas em uma forma cerâmica macroporosa, esférica. O termo "cHA" engloba, mas não é limitado a, hidroxiapatita cerâmica de tipo I e tipo II. Salvo especificado, "cHA" se refere a qualquer tamanho de partícula incluindo, mas não limitado a 20, 40 e 80  $\mu m$ .

[31] O termo "agregados de elevado peso molecular" ou "HMWA" refere-se a uma associação de pelo menos dois anticorpos. A associação pode surgir por qualquer método incluindo, mas não limitado a reticulação covalente, não covalente, dissulfeto, ou não redutível. Pelo menos dois anticorpos podem se ligar ao mesmo ou diferentes antígenos. Pelo menos dois anticorpos podem estar na forma de um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou outras formas descritas na definição de "anticorpo" acima.

[32] O termo "modo de fluxo transpassante" refere-se a uma técnica de separação de preparação de anticorpos em que pelo menos um anticorpo contido na preparação se destina a fluir através de uma resina cromatográfica ou suporte, enquanto pelo menos um contami-

nante ou impureza em potencial se liga à resina ou suporte cromatográfico. O modo de fluxo transpassante pode ser usado, por exemplo, em cromatografia de hidroxiapatita e cromatografia de troca iônica.

[33] "Modo de ligação" refere-se a uma técnica de separação de preparação de anticorpos em que pelo menos um anticorpo contido a preparação se liga a uma resina ou suporte cromatográfico, enquanto pelo menos um contaminante ou impureza flui através do mesmo. O modo de ligação pode ser usado, por exemplo, em cromatografia de hidroxiapatita ou cromatografia de troca iônica.

#### **Descrição do método**

[34] A presente invenção provê métodos para remover agregados de elevado peso molecular (HMWA) a partir de preparações de anticorpo usando cromatografia de hidroxiapatita em modo de ligação, modo de fluxo transpassante, ou uma combinação dos mesmos. A presente invenção tem aplicação na purificação em larga escala de preparações de anticorpos.

[35] Em modo de ligação, o método usa um suporte de hidroxiapatita carregado com fosfato em pH neutro e resistência iônica baixa para ligar tanto o anticorpo como HMWA. A coluna é então lavada com um tampão fosfato para remover impurezas ligadas de modo solto. A seguir, o anticorpo é seletivamente eluído usando um tampão fosfato de potência iônica elevada contendo 0,2 a 2,5 M de NaCl a um pH levemente ácido a levemente básico. HMWA é opcionalmente subsequentemente lavado da resina usando uma potência iônica ainda maior e um tampão de concentração de fosfato maior em pH neutro. Por último, a resina é opcionalmente regenerada usando solução de hidróxido de sódio e fosfato de potássio.

[36] Em modo de fluxo transpassante, uma preparação de anticorpo é trocada em tampão em um tampão de carga contendo 0,2 a 2,5 M de NaCl em um pH levemente ácido a levemente básico. A pre-

paração de anticorpos é então deixada fluir através de uma coluna de hidroxiapatita, enquanto impurezas como HMWA se ligam à coluna. A coluna é opcionalmente subsequente lavada para deixar os anticorpos purificados adicionais fluir através da coluna. Por último, a coluna pode ser opcionalmente extraída e então regenerada usando uma solução de hidróxido de sódio e fosfato de potássio.

[37] Em um modo de ligação / fluxo transpassante em combinação, a preparação de anticorpos é deixada fluir através de uma coluna de hidroxiapatita, com tanto monômero de anticorpo como ligação de HMWA inicialmente. No entanto, à medida que a carga continua, o HMWA que entra é capaz de se ligar mais firmemente do que o monômero anticorpo e, assim, desloca o monômero ligado. Conseqüentemente, o monômero deslocado flui através da coluna. A coluna é opcionalmente subsequente lavada para permitir que anticorpos deslocados adicionais escoem através da coluna. Por último, a coluna pode ser opcionalmente extraída com uma solução de elevado teor de sal, elevado teor de fosfato, e então regenerada usando uma solução de hidróxido de sódio e fosfato de potássio.

[38] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo purificado contém menos que 5% HMWA, em uma modalidade menos que 3% HMWA, e em outra modalidade menos que 1% HMWA.

### **Os anticorpos**

[39] As preparações de anticorpos da invenção podem ser isoladas de várias fontes incluindo, mas não limitadas a soro de animais imunizados, fluido ascites, sobrenadantes de hibridoma ou mieloma, meio condicionado derivado de cultivo de uma linhagem de célula recombinante que expressa a molécula de anticorpo e de todos os extratos de células de células produzindo anticorpos. Em uma modalidade da invenção, os anticorpos de meios de cultura de células condicionadas de linhagens de células recombinantes produzindo anticorpos são

purificados. Apesar de se esperar alguma variação de linhagem de célula a linha de célula e dentre os vários produtos de anticorpos, com base na descrição aqui, os versados na técnica conhecem bem uma adaptação da invenção aqui a uma combinação particular de proteína de anticorpos e produção de linha de célula.

[40] Para fins de ilustração apenas, esta invenção foi aplicada à purificação de vários anticorpos de isotipo IgG e pI básico. Mais especificamente, esta invenção foi aplicada a anticorpos monoclonais contra GDF-8 descritos pelo pedido de patente provisório de patente US 60/419 964 (a seguir "Myo-29"), anticorpos monoclonais especificamente reativos com o antígeno CD22 descrito no pedido de patente US 10/ 428 894 (a seguir "anti-CD22"), e anticorpos monoclonais contra antígeno Abeta descrito no pedido internacional no. PCT/US01/46587 (a seguir "anti-Abeta"). A construção de sistemas recombinantes para a produção de Myo-29 e os anticorpos CD22 e Abeta é detalhada nos pedidos acima mencionados.

## **2. A resina de hidroxiapatita**

[41] Várias resinas cromatográficas de hidroxiapatita são comercialmente disponíveis, e qualquer forma disponível do material pode ser usada na prática desta invenção. Em uma modalidade da invenção, a hidroxiapatita está em forma cristalina. As hidroxiapatitas para uso nesta invenção podem ser as que são aglomeradas para formar partículas e sinterizadas em temperaturas elevadas em uma massa cerâmica porosa estável.

[42] O tamanho de partícula da hidroxiapatita pode variar amplamente, mas um tamanho de partícula típico está na faixa de 1  $\mu\text{m}$  a 1.000  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e pode ser de 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . Em uma modalidade da invenção, o tamanho de partícula é de 20  $\mu\text{m}$ . Em outra modalidade da invenção, o tamanho de partícula é de 40  $\mu\text{m}$ . Em ainda outra modalidade da invenção, o tamanho de partícula é de 80  $\mu\text{m}$ .

[43] Vários suportes cromatográficos podem ser empregados na preparação de colunas de cHA, os mais extensivamente usados são hidroxiapatita tipo I e tipo II. O tipo I tem uma capacidade de ligação a proteína elevada e melhor capacidade para proteínas ácidas. O tipo II, no entanto, tem uma menor capacidade de ligação a proteína, mas tem uma melhor resolução de ácidos nucleicos e algumas proteínas. O material de tipo II também tem uma afinidade muito baixa para albumina e é especialmente apropriado para a purificação de muitas espécies e classes de imunoglobulinas. A escolha de um tipo de hidroxiapatita particular pode ser determinada pelo versado na técnica.

[44] Esta invenção pode ser usada com resina de hidroxiapatita que é solta, compactada em uma coluna, ou em um cromatógrafo anual contínuo. Em uma modalidade da invenção, a resina de hidroxiapatita cerâmica é compactada em uma coluna. A escolha de dimensões de coluna pode ser determinada pelo versado na técnica. Em uma modalidade da invenção, um diâmetro de coluna de pelo menos 0,5 cm com uma altura de leito de cerca de 20 cm pode ser usado para a purificação em escala pequena. Em uma modalidade adicional da invenção, um diâmetro de coluna de cerca de 35cm a cerca de 60 cm pode ser usado. Em ainda outra modalidade da invenção, um diâmetro de coluna de 60 cm a 85 cm pode ser usado. Em algumas modalidades da invenção, uma suspensão de resina de hidroxiapatita cerâmica em solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de 200 mM a pH 9,0 pode ser usada para compactar a coluna em uma taxa de fluxo constante de cerca de 4 cm/min ou com gravidade.

## **2. Composições de tampão e condições de carga**

[45] Antes de contatar a resina de hidroxiapatita com a preparação de anticorpo, pode ser necessário ajustar os parâmetros como pH, resistência iônica, e temperatura e, em alguns casos, a adição de substâncias de tipos diferentes. Assim, é uma etapa opcional realizar

um equilíbrio da matriz de hidroxiapatita por lavagem da mesma com uma solução (por exemplo um tampão para ajustar o pH, resistência iônica, etc, ou para a introdução de um detergente), com as características necessárias para purificação da preparação de anticorpos.

[46] Em cromatografia de hidroxiapatita em modo de ligação / fluxo transpassante em combinação, a matriz de hidroxiapatita é equilibrada e lavada com uma solução, assim ocasionando as características necessárias para purificação da preparação de anticorpo. Em uma modalidade da invenção, a matriz pode ser equilibrada usando uma solução contendo de 0,01 a 2,0 M de NaCl em pH levemente básico a levemente ácido. Por exemplo, o tampão de equilíbrio pode conter 1 a 20 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 1 a 10 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 2 a 5 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 2 mM de fosfato de sódio, e em outra modalidade pode conter 5 mM de fosfato de sódio. O tampão de equilíbrio pode conter 0,01 a 2,0 M de NaCl, em uma modalidade, 0,025 a 0,5 M de NaCl, em outra modalidade, 0,05 M de NaCl, e em outra modalidade 0,1M de NaCl. O pH do tampão de carga pode estar na faixa de 6,2 a 8,0. Em uma modalidade, o pH pode ser de 6,6 a 7,7, e em outra modalidade o pH pode ser 7,3. O tampão de equilíbrio pode conter 0 a 200 mM arginina, em outra modalidade pode conter 120 mM arginina, e em outra modalidade pode conter 100 mM arginina. O tampão de equilíbrio pode conter 0 a 200 mM HEPES, em outra modalidade pode conter 20 mM HEPES, e em outra modalidade pode conter 100 mM HEPES.

[47] A preparação de anticorpos pode ser trocada de tampão em um tampão apropriado ou tampão de carga na preparação para cromatografia de hidroxiapatita de modo de fluxo transpassante. Em outra modalidade da invenção, a preparação de anticorpos pode ser trocada de tampão em um tampão de carga contendo 0,2 a 2,5 M de

NaCl em pH levemente ácido a levemente básico. Por exemplo, o tampão de carga pode conter 1 a 20 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 2 a 8 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 3 a 7 mM de fosfato de sódio, e em outra modalidade pode conter 5 mM de fosfato de sódio. O tampão de carga pode conter 0,2 a 2,5 M de NaCl, em uma modalidade, 0,2 a 1,5 M de NaCl, em outra modalidade, 0,3 a 1,09 M de NaCl, e em outra modalidade, 350 mM de NaCl. O pH do tampão de carga pode estar na faixa de 6,4 a 7,6. Em uma modalidade, o pH pode ser de 6,5 a 7,0, e em outra modalidade o pH pode ser 6,8.

[48] O contato de uma preparação de anticorpos para a resina de hidroxiapatita em modo de ligação, modo de fluxo transpassante, ou combinações dos mesmos pode ser realizado em uma coluna de leito compactado, uma coluna de leito fluidizado/ expandido, contendo a matriz de fase sólida, e/ou uma operação de batelada simples, onde a matriz em fase sólida é misturada com a solução durante um certo tempo.

[49] Após contatar a resina de hidroxiapatita com a preparação de anticorpos, realiza-se opcionalmente um procedimento de lavagem. No entanto, em alguns casos, onde uma pureza muito elevada da imunoglobulina não é crítica ou o fluxo transpassante adicional de anticorpo não é requerido, o procedimento de lavagem pode ser omitido, economizando uma etapa de processo assim como solução de lavagem. Os tampões de lavagem empregados irão depender da natureza da resina de hidroxiapatita, o modo de cromatografia de hidroxiapatita sendo empregado, e assim podem ser determinados por um versado na técnica. No modo de fluxo transpassante, e modo de ligação / fluxo transpassante em combinação, o fluxo transpassante de anticorpo purificado obtido após uma lavagem opcional da coluna pode ser reunidos com outras frações de anticorpo purifi-

cado.

[50] No modo de ligação, o anticorpo pode ser eluído da coluna após um procedimento de lavagem opcional. Para eluição do anticorpo da coluna, a invenção usa um tampão fosfato de elevada resistência iônica contendo cerca de 0,2 a 2,5 M de NaCl em pH levemente ácido a levemente básico. Por exemplo, o tampão de eluição pode conter 1 a 20 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 2 a 8 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 2 a 6 mM de fosfato de sódio, em outra modalidade pode conter 3 mM de fosfato de sódio, e em outra modalidade pode conter 5 mM de fosfato de sódio. O tampão de eluição pode conter 0,2 a 2,5 M de NaCl, em uma modalidade 0,2 a 1,5 M de NaCl, em outra modalidade 0,3 a 1,1 M de NaCl, em outra modalidade, 1,0 M de NaCl, e em outra modalidade, 0,35 M de NaCl. O pH do tampão de eluição pode estar na faixa de 6,4 a 7,6. Em uma modalidade, o pH pode ser de 6,5 a 7,3, em outra modalidade o pH pode ser 7,2, e em outra modalidade o pH pode ser 6,8. O tampão de eluição pode ser alterado para eluição do anticorpo da coluna em um gradiente em etapas ou contínuo.

[51] Em tanto em modo de ligação, como em fluxo transpassante, e combinações dos mesmos, uma matriz em fase sólida pode ser opcionalmente limpa, isto é, extraída e regenerada, após eluição ou fluxo transpassante do anticorpo. Este procedimento é tipicamente realizado regularmente para minimizar o acúmulo de impurezas sobre a superfície da fase sólida e/ou para esterilizar a matriz para evitar contaminação do produto com microorganismos.

[52] Os componentes de tampão podem ser ajustados de acordo com o conhecimento do versado na técnica. As faixas de composição de tampão de amostra e exemplos para o modo de ligação, modo de fluxo transpassante, e modo de ligação /fluxo transpassante em combinação são dadas na tabela 1, tabela 2 e tabela 3, respectiva-

mente. Nem todos os tampões ou etapas são necessários, mas são providos para ilustração apenas. Por exemplo, pode não ser necessário ter duas etapas de equilíbrio distintas, e pode não ser necessário extrair, regenerar, ou armazenar a resina de hidroxiapatita. Uma triagem de elevada produção, como descrito no exemplo 11, pode ser usada para otimizar de modo eficaz as condições de tampão para a cromatografia de coluna de cHA.

**Tabela 1 - Faixas de composição de tampão de exemplo para modo de ligação**

<b>Tampão</b>	<b>Faixa de composição</b>	<b>Composição (s) exemplo</b>
Equilíbrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0M de NaCl pH 6,8
Equilíbrio 2	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0 a 200 mM de NaCl pH 6,4 a 7,4	5,0 mM de fosfato de sódio 50 mM de NaCl pH 7,2
Lavagem	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0 a 200 mM de NaCl pH 6,4 a 7,4	5,0 mM de fosfato de sódio 50 mM de NaCl pH 7,2
Eluição	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,2 a 2,5 M de NaCl pH 6,4 a 7,6	5,0 mM de fosfato de sódio 350 mM de NaCl pH 6,8; ou 3,0 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 7,2
Extração	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,8
Regeneração	0,5 a 1,0 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH	0,5 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH
Armazenagem	10 a 50 mM NaOH	20 mM NaOH

**Tabela 2. Faixas de composição de tampão de exemplo para modo de fluxo transpassante**

<b>Tampão</b>	<b>Faixa de composição</b>	<b>Composição de exemplo</b>
Equilíbrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0M de NaCl pH 6,8
Equilíbrio 2	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,2 a 2,5 M de NaCl pH 6,4 a 7,6	5,0 mM de fosfato de sódio 350 mM de NaCl pH 6,8
Tampão de carga	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,2 a 2,5 M de NaCl pH 6,4 a 7,6	5,0 mM de fosfato de sódio 350 mM de NaCl pH 6,8

Lavagem	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,2 a 2,5 M de NaCl pH 6,4 a 7,6	5,0 mM de fosfato de sódio 350 mM de NaCl pH 6,8
Extração	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,8
Regeneração	0,5 a 1,0 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH	0,5 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH
Armazenagem	10 a 50 mM NaOH	20 mM NaOH

**Tabela 3. Faixas de composição de tampão de exemplo para modo de ligação / fluxo transpassante em combinação**

<b>Tampão</b>	<b>Faixa de composição</b>	<b>Composição (s) exemplo</b>
Equilíbrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0M de NaCl pH 6,8
Equilíbrio 2	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,01 a 2,0 M de NaCl 0 a 200 mM arginina 0 a 200 mM HEPES pH 6,2 a 8,0	2,0 mM de fosfato de sódio 50 mM de NaCl, 100 mM arginina 100 mM HEPES, pH 7,3; ou 5,0 mM de fosfato de sódio 100 mM de NaCl, 120 mM arginina, 20 mM HEPES, pH 7,3
Lavagem	1 a 20 mM de fosfato de sódio 0,01 a 2,0 M de NaCl 0 a 200 mM arginina 0 a 200 mM HEPES pH 6,2 a 8,0	2,0 mM de fosfato de sódio 50 mM de NaCl, 100 mM arginina 100 mM HEPES, pH 7,3; ou 5,0 mM de fosfato de sódio 100 mM de NaCl, 120 mM arginina, 20 mM HEPES, pH 7,3
Extração	10 mM a 500 mM de fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,4 a 7,4	0,3 M fosfato de sódio 1,0 M de NaCl pH 6,8
Regeneração	0,5 a 1,0 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH	0,5 M fosfato de potássio 1,0 M NaOH
Armazenagem	10 a 50 mM NaOH	20 mM NaOH

[53] Em uma modalidade da invenção, a carga sobre a resina de cHA pode estar, por exemplo, em um desafio de carga de  $\leq 20$  mg/ml e um nível de agregado de partida na carga de  $\leq 40\%$  de HMWA. Em algumas modalidades da invenção, um desafio de carga de 1,8 a 10,4 mg/ml pode ser usado com um nível de agregado de partida na carga de cerca de 15%.

[54] Em uma modalidade adicional da invenção, a resina de cHA é carregada em um desafio de carga de pelo menos 20 mg/ml e um nível de agregado de partida na carga de  $\leq 40\%$  de HMWA. Em algumas modalidades da invenção, um desafio de carga de 30 a 40

mg/ml pode ser usado com um nível de agregado de partida na carga de cerca de 27%.

### **3. Etapas opcionais adicionais**

[55] Apesar de ter sido descoberto que a cromatografia de hidroxapatita pode ser usada sozinha para separar IgG monomérico de agregados, como acima mencionado, o método de purificação da invenção pode ser usado em combinação com outras técnicas de purificação de proteínas. Em uma modalidade da invenção, uma ou mais etapas precedendo a etapa de hidroxapatita pode ser desejável para reduzir o desafio de carga dos contaminantes ou impurezas. Em outra modalidade da invenção, uma ou mais etapas de purificação após a etapa de hidroxapatita podem ser desejáveis para remover contaminantes ou impurezas adicionais.

[56] O procedimento de purificação de cHA descrito pode ser opcionalmente combinado com outras etapas de purificação incluindo, mas não limitadas à cromatografia de Proteína A, cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade de metal imobilizado, cromatografia de exclusão de tamanho, diafiltração, ultra filtração, filtração de remoção viral e/ou cromatografia de troca iônica.

[57] Em uma modalidade, antes da etapa de purificação de cHA, os meios de coleta podem ser opcionalmente purificados inicialmente por uma etapa de cromatografia de Proteína A. Por exemplo, PRO-SEP-A<sup>®</sup> (Millipore, U.K.), que consiste em Proteína A covalentemente copulada em vidro de poro controlado, pode ser geralmente empregado. Outras formulações de Proteína A utilizáveis incluem colunas de Sepharose de Proteína A FAST FLOW<sup>®</sup> (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), de Proteína A TOYOPEARL<sup>®</sup> 650M (TosoHaas Co., Philadelphia, PA), e MABSELECT<sup>®</sup> (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

[58] Como uma etapa opcional anterior à purificação de cHA, cromatografia de troca iônica pode ser empregada. Neste aspecto, vários substituintes aniônicos ou catiônicos podem ser fixados nas matrizes a fim de

[59] formar suportes aniônicos ou catiônicos para cromatografia. Os substituintes de troca aniônica incluem dietilaminoetila (DEAE), trimetilaminoetil acrilamida (TMAE), grupos aminoetila quaternária (QAE) e amina quaternária (Q). Os substituintes de troca catiônicos incluem carboximetila (CM), sulfoetila (SE), sulfopropila (SP), fosfato (P) e sulfonato (S). Resinas de troca iônica celulósicas como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 e CM-52 são disponíveis de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. Os trocadores iônicos reticulados e à base de Sephadex são também conhecidos. Por exemplo, DEAE-, QAE-, CM-, e SP-Sephadex, e DEAE-, Q-, CM- e S-Sepharose, e Sepharose são todos disponíveis de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Ainda, copolímero de etileno glicol-metacrilato derivatizado tanto de DEAE como de CM, como TOYOPEARL® DEAE-650S ou M e TOTYPEARL® CM-650S ou M são disponíveis de Toso Haas Co., Philadelphia, PA.

[60] Em uma modalidade da invenção, cromatografia de troca iônica pode ser usada em modo de ligação ou modo de fluxo transpassante.

[61] Em algumas modalidades, a etapa de cromatografia de Proteína A é conduzida em primeiro, a etapa de troca aniônica é conduzida em segundo, e a etapa de cHA é conduzida em terceiro lugar.

#### **4. Remoção de Impurezas Adicionais**

[62] Além da remoção de HMWA, a cromatografia de cHA foi demonstrada como utilizável para remover outras impurezas de preparações de anticorpos. Outras impurezas que podem ser removidas pelos métodos de cromatografia de cHA da invenção incluem, mas não são limitadas a DNA, proteína de célula hospedeira, vírus adventícios,

e contaminantes de Proteína A de etapas de purificação anteriores.

[63] Em uma modalidade da invenção, a invenção é capaz de remover a Proteína A da preparação de anticorpo. Em algumas modalidades desta invenção, a quantidade de Proteína A presente na preparação final pode ser significativamente reduzida, como de 300 ppm a menos que 1 ppm.

### **Exemplos**

[64] Os seguintes exemplos são oferecidos para fins de ilustração apenas.

#### **Exemplo 1: Purificação de um Anticorpo Anti-GDF-8**

[65] O processo de purificação descrito abaixo foi desenvolvido para um anticorpo monoclonal anti-GDF-8 (referido aqui como "Myo-29"). O anticorpo Myo-29 é um anticorpo subtipo IgG1 e tem um pI de aproximadamente 8.1. O processo de purificação era composto de três etapas cromatográficas (afinidade de Proteína A, troca aniônica, e hidroxiapatita), uma etapa de inativação viral, e uma etapa de ultrafiltração/diafiltração para concentrar e trocar o produto em um tampão final. Todas as etapas foram realizadas a 18 a 25 °C, exceto a etapa de cromatografia de Proteína A, que foi ciclada a 2 a 8 °C.

[66] O processo de purificação pode ser normalizado para qualquer escala. As taxas de fluxo lineares listadas são independentes do diâmetro da coluna e as relações de carga são em massa por volume unitário. A etapa de cromatografia de Proteína A pode ser ciclada múltiplas vezes por batelada para acomodar variadas quantidades de título de cultura celular no biorreator do coletor. Cada ciclo é considerado uma operação unitária separada e a poça de eluição é mantida para a próxima etapa. A etapa de Proteína A tem uma capacidade de aproximadamente 35 gramas de Myo-29 por litro de MabSelect. As etapas a jusante do processo (por exemplo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de hidroxiapatita cerâmica) são escalonadas para aco-

modar aproximadamente 15 gramas de Myo-29 por litro de resina de troca aniônica e em torno 10 gramas de Myo-29 por litro de resina de hidroxapatita cerâmica.

### **Remoção de Células de Cultura**

[67] O anticorpo Myo-29 foi expressado em células de ovário de hamster chinês (CHO) e foi cultivado em um biorreator de tanque agitado de 2500 L. Para coletar o fluido de cultura, as células foram removidas usando um dispositivo de microfiltração Prostack (Millipore, Billerica, MA). O meio condicionado depurado (CCM) foi coletado para a primeira etapa cromatográfica, cromatografia de Proteína A.

### **2. Etapa de purificação de cromatografia de afinidade de Proteína A**

[68] Uma coluna MabSelect de 17,7 L (30 cm de diâmetro x 25 cm de altura) de resina de Proteína A recombinante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) foi equilibrada com 5 volumes de coluna de um tampão de equilíbrio (10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, pH 7,5). O CCM foi aplicado na coluna em uma taxa de fluxo de 2,5 cm/min e um desafio de carga de 35 g de Myo-29 por litro de resina. Após carregar a coluna, ela foi lavada com 5 volumes de coluna de um tampão de lavagem de teor de sal elevado (20 mM de Tris, 1,0 M de NaCl, pH 7,5) e então com 10 volumes de coluna em um tampão de lavagem de teor de sal baixo (10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, pH 7,5). O Myo-29 foi eluído por aplicação de 6 volumes de coluna de um tampão de eluição (100 mM de arginina, 50 mM de NaCl, pH 3,0). A poça de eluição foi então mantida a um pH de  $3,6 \pm 0,5$  para  $1,5 \pm 0,5$  hora como uma medida profilática para facilitar a inativação de contaminantes virais adventícios potenciais. A poça de eluição foi então neutralizada a pH 7,3 com 2 M de tampão HEPES a pH 8,0, para evitar a degradação de porções lábeis de ácido de Myo-29.

[69] Efluentes de coluna foram monitorados por vários parâme-

tros, incluindo inspeção visual de perfis cromatográficos de condutividade e de absorbância de UV, e a recuperação de produto usando HPLC de Proteína A para o título de carga e absorbância a 280 nm para a concentração de poça de eluição.

[70] A coluna foi extraída com 6M de HCl de guanidina e então lavada com tampão de lavagem de extração (10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, pH 7,5). A coluna foi armazenada em 16% de etanol.

### **3. Etapa de purificação de cromatografia de troca aniônica**

[71] O eluente de coluna de Proteína A foi ainda purificado por cromatografia de troca aniônica em uma coluna de 75 L (80 cm de diâmetro X 15 cm de comprimento) de resina Q SEPHAROSE FF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de um primeiro tampão de equilíbrio (20 mM de HEPES, 1000 mM de NaCl, pH 7,3) e então com 5 volumes de coluna de um segundo tampão de equilíbrio (100 mM de arginina, 50 mM de NaCl, 100 mM de HEPES, pH 7,3). O eluente de coluna de Proteína A foi aplicado na coluna equilibrada em uma taxa de fluxo de 2,5 cm/min e uma relação de carga de 15 gramas de Myo-29 por litro de resina. Após carregar, a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna do segundo tampão de equilíbrio. O fluxo transpassante da coluna de troca aniônica foi coletado.

[72] O fluxo transpassante de coluna coletado foi monitorado por vários parâmetros, incluindo inspeção visual de perfis cromatográficos de condutividade e de absorbância de UV, e a recuperação de produto usando absorbância a 280 nm.

[73] A coluna de troca aniônica foi extraída com tampão de extração (20 mM de HEPES, 1 M de NaCl, pH 7,3) e regenerada com tampão de regeneração (500 mM de NaOH, 1 M de NaCl, pH 13,3). A coluna foi armazenada em 0,01 M de NaOH.

### **4. Filtração para reter vírus**

[74] O objetivo desta etapa opcional foi a remoção de partículas semelhantes a retrovirais, que podem estar presentes em cultura de células CHO e para prover uma segurança adicional através da remoção de contaminantes virais adventícios em potencial. O fluxo transpassante de coluna de troca aniônica foi coletado e passado através de um filtro de uso único Planova de 35 nm (Asahi-Kasei Corp., New York, NY). O produto restante no módulo foi recuperado por passagem em tampão de lavagem de coluna de troca aniônica (100 mM de arginina, 50 mM de NaCl, 100 mM de HEPES, pH 7,3) através do dispositivo.

[75] A recuperação do produto após a filtração de retenção de vírus foi avaliada por absorbância a 280 nm e análise SDS-PAGE de poça Planova em comparação com os dados de desempenho históricos.

##### **5. Etapa de purificação de cromatografia de cHA**

[76] A solução filtrada viral foi ainda purificada com uma coluna de hidroxiapatita (60 cm x 20 cm) compactada com resina de cHA tipo II, 40 µM de tamanho de partícula (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (0,3 M de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8). Uma segunda etapa de equilíbrio foi conduzida com 4 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (5 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, pH 7,2). O meio parcialmente purificado foi carregado sobre a resina em um tampão de carga 1:1 (v/v) (10 mM de fosfato de sódio, pH 7,2) e em uma taxa de fluxo de 2,5 cm/min. A coluna de cHA foi lavada com 3 volumes de coluna de um tampão de lavagem (5 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, pH 7,2). O anticorpo Myo-29 foi eluído de resina de cHA usando 6 volumes de coluna de um tampão de eluição (5 mM de fosfato de sódio, 350 mM de NaCl, pH 6,8).

[77] A etapa de purificação de cHA foi monitorada por inspeção

visual de perfis cromatográficos de condutividade e de absorvância de UV, recuperação de produto por absorvância a 280 nm, remoção por HMWA como determinado por análise de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), e remoção de Proteína A, como determinado por um teste imunossorvente ligado à enzima competitivo (ELISA).

[78] A coluna de cHA foi extraída com tampão de extração (0,3 M de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e regenerado com tampão de regeneração (0,5 M de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH, pH 13,3). A coluna foi armazenada em 0,02 M de NaOH. A Tabela 4 demonstra que a cromatografia de cHa efetivamente remove as impurezas em HMWA das preparações de anticorpo. Além disso, a cromatografia de cHA é capaz de remover outras impurezas, como Proteína A.

Tabela 4. Rendimentos de monômero de anticorpos e depuração de HMWA

Amostra	% de carga HMWA	% de pico HMWA	Carga ProA (ppm)	Pico ProA
1	14,6	1,0	17	BLOQ*
2	16,4	0,7	20	BLOQ
3	15,1	1,6	23	BLOQ
4	16,0	0,9	13	BLOQ

[79] \*BLOQ = abaixo do limite de quantificação de 1 ng/ml.

## 6. Ultrafiltração/diafiltração e filtração final

[80] A poça de eluição de cHA foi passada através de um sistema de ultrafiltração de fluxo tangencial usando cassetes de PLCTK Pellicon 2 (Millipore, Billerica, MA) composto de uma membrana de celulose regenerada compósita, com um limite de peso molecular nominal de 30.000. Os objetivos desta etapa foram concentrar e trocar, em tampão, a poça do produto de cHA no tampão de formulação. A poça do produto de cHA foi salpicada com uma solução a 50% sacarose (p/v) para levar a concentração de sacarose a 2%. O anticorpo Myo-29 foi concentrado a aproximadamente 20 gL<sup>-1</sup>, então diafiltrado com aproximadamente ≥ 9 volumes de lavagem de tampão de formulação (0,01 M de L-histidina, 2% de sacarose, pH 6,0). Ao completar a

diafiltração, o produto foi ainda concentrado a aproximadamente 60 gL<sup>-1</sup> e recuperado do aparelho por dreno por gravidade e um sopro de ar descendente, seguido por lavagem dos canais de retenção com o tampão de formulação. O alvo de concentração do Myo-29 na substância de droga é de  $\geq 35$  g/L.

[81] A substância de droga Myo-29 foi finalmente filtrada através de um filtro de 0,22 micron, equilibrado com tampão de formulação (0,01 M de L-histidina, 2% de sacarose, pH 6,0), dividida em alíquotas em frascos, e então armazenada a -80 °C.

### **Exemplo 2: Purificação de cHA de um anticorpo anti-GDF-8**

#### **Preparação usando resina tipo I**

[82] O anticorpo Myo-29 também foi purificado com sucesso usando resina de cHA do tipo I, 40  $\mu$ M do tamanho da partícula, compactada em uma coluna de 3,1 L. A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (0,3 M de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8). Uma segunda etapa de equilíbrio foi conduzida com 4 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (5 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, pH 7,2). O meio parcialmente purificado de uma etapa de purificação de troca aniônica foi carregado sobre a resina em um desafio de carga de 35 mg/ml e em uma taxa de fluxo de 1,5 cm/min. A coluna de cHA foi lavada com 3 volumes de coluna de um tampão de lavagem (5 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, pH 7,2). O anticorpo Myo-29 foi eluído de resina de cHA usando 6 volumes de coluna de um tampão de eluição (3 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 7,2).

[83] A coluna de cHA foi extraída com tampão de extração (0,3 M de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e regenerada com tampão de regeneração (0,5 M de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH, pH 13,3). A coluna foi armazenada em 0,02 M de NaOH.

[84] A etapa de purificação de cHA foi monitorada por inspeção

visual de perfis cromatográficos de condutividade e de absorvância de UV, recuperação de produto por absorvância a 280 nm, remoção por HMWA como determinado por análise de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), e remoção de Proteína A, como determinado por um teste imunossorvente ligado à enzima competitivo (ELISA). Como mostrado na tabela 5, a purificação de cHA usando resina do tipo I foi capaz de diminuir o HMWA percentual de 27% a 0,9% no primeiro ciclo, e ainda diminuir o HMWA percentual a 0,6% no segundo ciclo. Além disso, a resina do tipo I acomodou um desafio de carga maior do que a resina de tipo II, enquanto ainda produzindo um rendimento de monômero suficiente. Finalmente, a purificação de cHA usando resina do tipo I é capaz de diminuir a quantidade de impureza de Proteína A.

**Tabela 5. Depuração de HMWA e rendimentos de monômero de anticorpo usando resina tipo I**

Amostra	% de HMWA	% de rendimento de monômero	Proteína A (ppm)
carga cHA	27,0	N/A	169
pico cHA (ciclo #1)	0,9	86,6	BLOQ*
pico cHA (ciclo #2)	0,6	86,6	BLOQ

\*BLOQ = abaixo do limite de quantificação de 1 ng/ml

### **Exemplo 3: Purificação de cHA de uma preparação de anticorpo anti-CD22 e uma preparação de anticorpo anti-Abeta usando resina do tipo I**

[85] O processo de purificação de cHA descrito no exemplo 2 também foi capaz de remover suficientemente HMWA de tanto um anti-CD22 e como de um anti-Abeta exemplo 2, com a exceção que o monômero de anticorpo purificado foi eluído com gradiente em 15 volumes de coluna de tampão de eluição (3 mM de fosfato de sódio, 1,5 M de NaCl, pH 7,2).

[86] Como demonstrado na tabela 6, a purificação de cHA usando resina do tipo I foi capaz de diminuir HMWA na preparação de anticorpo anti-CD22 a 0,5% e na preparação de anticorpo anti-Abeta a abaixo do limite de detecção. Além disso, a etapa de purificação de

cHA foi capaz de remover os contaminantes de Proteína A da preparação de anticorpos.

Tabela 6. Depuração de HMWA e rendimentos de monômero de anticorpos usando resina do tipo I na purificação de preparações de anticorpos anti-CD22 e anti-Abeta

Amostra	% de HMWA	% de rendimento de monômero	Proteína A (ppm)
carga anti-CD22	3,7	N/A	30
pico anti-CD22	0,5	87	BLOQ*
carga anti-Abeta	1,87	N/A	40
pico anti-Abeta	0,0	89	BLOQ

\*BLOQ = abaixo do limite de quantificação de 1 ng/ml

#### **Exemplo 4: Purificação de cHA em modo de fluxo transpassante de um anticorpo anti-GDF-8**

[87] O anticorpo Myo-29 também foi purificado com sucesso usando um protocolo de purificação de cHA de modo de fluxo transpassante. Uma coluna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) foi compactada em 200 mM de fosfato de sódio dibásico, pH 9,0 usando hidroxiapatita cerâmica de macro-prep do tipo II, 40  $\mu$ M da resina do tamanho de partícula (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (350 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8). A preparação do anticorpo Myo-29 foi trocada em tampão em um tampão de carga contendo 350 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8 e então carregada sobre a coluna de cHA. A coluna foi lavada com tampão de lavagem (350 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8), extraída com tampão de extração (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8), e então regenerada com tampão de regeneração (500 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH, pH 13,3). Todas as taxas de fluxo foram mantidas a 2,5 a 3 cm/min. Os efluentes de coluna foram analisados por SEC-HPLC usando um sistema HPLC.

[88] Um resumo da recuperação de Myo-29 e remoção de HMWA da preparação de anticorpo é apresentado na tabela 7. A preparação inicialmente continha 14,4% de HMWA (carga), que foi reduzida a 0,2% de HMWA (fluxo transpassante) usando o método de purificação de cHA da invenção.

**Tabela 7. Recuperação de Myo-29 e remoção de HMWA**

Amostra	% de recuperação de Myo-29	% de HMWA em amostra
carga	N/A	14,4
fluxo transpassante	79,6	0,2
lavagem	12,2	1,9
pós-lavagem	1,5	5,6
extração	10,3	84,3

**Exemplo 5: Purificação de cHA em modo de fluxo transpassante de um anticorpo anti-GDF-8 usando resina do tipo I**

[89] Uma coluna Vantage de 1,1 x 21 cm (Millipore, Billerica, MA) foi compactada em 200 mM de fosfato de sódio dibásico, pH 9,0 usando hidroxiapatita cerâmica macro-prep do tipo I, 40  $\mu$ M de resina do tamanho de partícula (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (1,0 M de NaCl, 3 mM de fosfato de sódio, pH 7,2). A preparação de anticorpo de Myo-29 foi trocada com tampão em um tampão de carga contendo 1,0 M de NaCl, 3 mM de fosfato de sódio, pH 7,2 e então carregada sobre a coluna de cHA em um desafio de carga de 26 mg/ml. A coluna foi lavada com tampão de lavagem (1,0 M de NaCl, 3 mM de fosfato de sódio, pH 7,2), extraída com tampão de extração (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8), e então regenerada com 5 volumes de coluna de tampão de regeneração (500 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH, pH 13,3). As taxas de fluxo foram mantidas menores do que 90 cm/h para a carga e lavagem e menores do que 240 cm/h para o resto do processo de purificação. Os efluentes da coluna foram analisados por SEC-HPLC usando um sistema HPLC.

[90] A preparação de anticorpo inicialmente continha 27,2% de HMWA (carga), o que foi reduzido a 6,1% de HMWA (fluxo transpassante). Além disso, a recuperação de monômero de anticorpo foi de 72%.

#### **Exemplo 6: Purificação de cHA de uma preparação de anticorpo anti-CD22**

[91] A purificação de cromatografia de HA cerâmica também foi mostrada como sendo utilizável na purificação de uma preparação de anticorpo anti-CD22. Uma coluna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) foi compactada em 200 mM de fosfato de sódio dibásico a pH 9,0 usando hidroxiapatita cerâmica macro-prep do tipo II, 40 µM de resina de tamanho de partícula (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8). Uma preparação de anticorpo anti-CD22 foi trocada com tampão em 50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8 e então carregada sobre a coluna de cHA. A coluna foi lavada com 3 volumes de coluna de tampão de lavagem (50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8) e então eluída com gradiente com 5 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8 em 15 volumes de coluna. A coluna foi extraída com tampão de extração (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e então regenerada com tampão de regeneração (500 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH). Todas as taxas de fluxo foram mantidas a 2,5 a 3 cm/min. Os efluentes da coluna foram analisados por SEC-HPLC usando um sistema HPLC.

[92] Como mostrado na figura 3, a purificação de cHA obteve sucesso na remoção de HMWA da preparação de anticorpo anti-CD22. O HMWA percentual na carga foi de 1,7%, enquanto o HMWA percentual no eluente de cHA foi de 0,0%.

**Exemplo 7: Purificação de cHA de um anticorpo anti-Abeta**

[93] A purificação de cromatografia de HA cerâmica também foi mostrada como sendo utilizável na purificação de uma preparação de anticorpo anti-Abeta. Uma coluna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore) foi compactada em 200 mM de fosfato de sódio dibásico a pH 9,0 usando hidroxiapatita cerâmica macro-prep do tipo II, resina de tamanho de partícula de 40 µM (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8). Uma preparação de anticorpo anti-Abeta foi trocada em tampão em 50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8 e então carregada sobre a coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão de lavagem (50 mM de NaCl, 5 mM de fosfato de sódio, pH 6,8) e então eluída com gradiente com 5 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8 em 15 volumes de coluna. A coluna foi extraída com tampão de extração (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e então regenerada com tampão de regeneração (500 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH). Todas as taxas de fluxo são mantidas a 2,5 a 3 cm/min. Os efluentes da coluna foram analisados por SEC-HPLC usando um sistema HPLC.

[94] Como mostrado na figura 4, a purificação de cHA obteve sucesso na remoção de HMWA da preparação de anticorpo anti-Abeta. O HMWA percentual na carga foi de 2,6%, enquanto o HMWA percentual no eluente de cHA foi de 0,0%.

**Exemplo 8: Avaliação da atividade de anticorpo Myo-29 purificado**

[95] O anticorpo anti-GDF-8 purificado de acordo com o método descrito no exemplo 1, Myo-29, foi testado para atividade de ligação usando um teste imunossorvente ligado à enzima competitivo (ELISA). ELISA competitivo pode ser adaptado para testar a atividade de liga-

ção de outros anticorpos purificados. Ver por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Um receptor de GDF-8, ActRII $\beta$ .Fc (2  $\mu$ g/mL), foi adsorvido sobre uma placa de micro titulação de 96 cavidades em um volume de 100  $\mu$ l/cavidade. A placa foi então incubada a 2 a 8 °C durante a noite. A placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,05% de Tween 20) e bloqueada com 4% de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) para minimizar a ligação não específica. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 1,5 a 3,0 horas e lavada duas vezes com tampão de lavagem (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,05% de Tween 20).

[96] O padrão de referência de anticorpo Myo-29 foi diluído em série 4 vezes em diluente de teste (0,5% de BSA, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl), resultando em um total de 8 pontos padrão. As amostras de teste continham frações de anticorpo Myo-29 purificadas por uma etapa de cromatografia de Proteína A assim como frações purificadas após uma etapa de purificação de cHA adicional. Estas amostras de teste também foram diluídas em série 2 vezes em diluente de teste para resultar em 8 pontos que caem na faixa de curva padrão. Os padrões e amostras de teste foram adicionados às cavidades de teste apropriadas a 50  $\mu$ l/cavidade. O competidor biotilado, GDF-8 rotulado com biotina (50 ng/mL) foi então adicionado a cada cavidade a 50  $\mu$ l/ cavidade. A placa foi incubada durante a noite em um agitador de placa em temperatura ambiente.

[97] A placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,05% de Tween 20) e GDF-8 rotulado com biotina ligada foi detectado com o derivado de 100  $\mu$ l/cavidade de peroxidase de rábano silvestre conjugada à estreptavidina (1:5.000; Southern Biotech, Birmingham, Alabama). A placa foi incubada 50 a 70

minutos no agitador de placa em temperatura ambiente, e então desenvolvida por adição de 100 µl/ cavidade de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, Owings Mills, MD). A absorbância para cada cavidade é determinada a 450 nm com uma leitora de placa ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A quantidade de Myo-29 ativo na amostra de teste é indiretamente proporcional ao sinal gerado no teste. A reação foi parada por adição de 100 µl/cavidade 0,18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

[98] Uma concentração de Myo-29 capaz de ligar GDF-8 biotinilado nas amostras de teste foi interpolada da curva padrão que foi configurada usando uma equação logística de 4 parâmetros. O valor de bioatividade (% de proteína ativa) de uma amostra de teste foi então computado por divisão da concentração de proteína ativa (determinado por ELISA) pela concentração de proteína total (determinado por A<sub>280</sub>) e multiplicando esta relação por 100. Se a mesma amostra for purificada em bateladas separadas, médias do valor da bioatividade foram calculadas. Os valores da bioatividade são registrados na tabela 8.

Tabela 8. Atividade de ligação de anticorpo anti-GDF-8 (% de proteína ativa)

Amostra	Purificação pós-Proteína A	Purificação pós-cHA
1	88	108
2	86	104
3	94	108

[99] Como demonstrado na tabela 8, Myo-29 retém sua capacidade de ligar GDF-8 após ser purificado pelo processo descrito no exemplo 1. A atividade de ligação de Myo-29 purificado é um pouco menor do que nas frações de eluente de pico da purificação de Proteína A. No entanto, a atividade de ligação excede o anticorpo Myo-29 de referência após uma etapa de purificação de cHA adicional, como descrito no exemplo 1.

### **Exemplo 9 - Purificação de cHA em modo de ligação / fluxo transpassante em combinação de um anticorpo anti-GDF-8**

[100] A purificação por cromatografia de HA cerâmica em um modo de ligação / fluxo transpassante em combinação foi também mostrada como sendo utilizável na purificação de uma preparação de anticorpo anti-GDF-8. O experimento detalhado abaixo foi realizado em um sistema ÄKTA FPLC (General Electric). Uma coluna Vantage de 1,1 x 21 cm (Millipore) foi compactada em 200 mM de fosfato de sódio dibásico a pH 9,0 usando hidroxiapatita cerâmica macro-prep do tipo II, resina de tamanho de partícula de 40 µM (BioRad, Hercules, CA). A coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 1 (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8) e 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio 2 (50 mM de NaCl, 2,0 mM de fosfato de sódio, 100 mM de arginina, 100 mM de HEPES, pH 7,3). Uma preparação de anticorpo anti-GDF-8 foi carregada sobre a coluna com um desafio de carga de 20 mg/ml. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio 2, extraída com tampão de extração (300 mM de fosfato de sódio, 1,0 M de NaCl, pH 6,8), e então regenerada com tampão de regeneração (500 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaOH, pH 13,3). A taxa de fluxo para carga e lavagem foi de 1,5 cm/min. As taxas de fluxo para o resto do processo de purificação foram mantidas a 2,5 a 3,0 cm/min. Os efluentes de coluna foram analisados por SEC-HPLC usando um sistema HPLC.

[101] Os resultados demonstraram que a operação da resina de cHA tipo II no modo de ligação / fluxo transpassante em combinação é eficaz na remoção de HMWA das preparações de anticorpo. A preparação inicialmente continha 27% de HMWA (carga), que foi reduzida a 1,1% de HMWA (fluxo transpassante) usando o método de purificação de cHA da invenção.

**Exemplo 10 - Purificação de cHA em modo de ligação / fluxo transpassante em combinação de um anticorpo anti-GDF-8 usando resina tipo I**

[102] O procedimento descrito no exemplo 9 foi repetido usando resina de cHA do tipo I no lugar da resina de cHA do tipo II. As condições do tampão foram idênticas às usadas no exemplo 9, com a exceção do tampão de equilíbrio 2, que foi composto de 5,0 mM de fosfato de sódio, 100 mM de NaCl, 120 mM de arginina, 20 mM de HEPES, em um pH de 7,3.

[103] Como mostrado na tabela 9, a operação da resina de cHA do tipo I em modo de ligação /fluxo transpassante em combinação é eficaz para remover HMWA de preparações de anticorpo enquanto mantendo os rendimentos de monômero de anticorpo. Além disso, o modo de ligação /fluxo transpassante em combinação é eficaz para remover impurezas de Proteína A. Finalmente, a resina de cHA tipo I permitiu um desafio de carga aumentado de 55 mg/ml.

Tabela 9 - Depuração de HMWA e rendimentos de monômero de anticorpo de resina de cHA tipo I operada em modo de ligação /fluxo transpassante em combinação

Amostra		% de HMWA	% de rendimento do monômero	Proteína A (ppm)
Ciclo 1	carga	27,0	NA	236
	pico	0,9	75	3,3
Ciclo 2	carga	27,2	NA	---
	pico	0,7	78	---

#### **Exemplo 11 - Triagem de elevada produção de condições de tampão de cHA**

[104] Uma triagem de elevada produção foi realizada para otimizar as condições de tampão usadas para purificar uma preparação de anticorpo Myo-029 usando uma resina de cHA tipo I. A triagem variou os níveis de fosfato de sódio, cloreto de sódio, arginina e Myo-029 na resina de cHA tipo I e examinou a extensão de ligação de Myo-029 e o agregado de elevado peso molecular (HMWA) para a resina.

[105] A resina de cHA tipo I (50  $\mu$ L) foi adicionada a cada cavidade de uma placa de filtro de 96 cavidades. Cada cavidade, rotulada A1, A2...H11, H12 nas tabelas 10 a 12, foi equilibrada em tampão de

equilíbrio feito de 20 mM de HEPES, pH 7,2 e uma combinação única de fosfato (tabela 10), cloreto de sódio (tabela 11), e arginina (tabela 12).

**Tabela 10. Níveis de fosfato em cada cavidade**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
B	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
C	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
D	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
E	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
F	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
G	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
H	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM

**Tabela 11. Níveis de NaCl em cada cavidade**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
B	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
C	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1.250mM	1.750mM	2.500mM	600mM	800mM	1.000mM
D	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1.250mM	1.750mM	2.500mM	600mM	800mM	1.000mM
E	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
F	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
G	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1.250mM	1.750mM	2.500mM	600mM	800mM	1.000mM
H	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1.250mM	1.750mM	2.500mM	600mM	800mM	1.000mM

**Tabela 12. Níveis de arginina em cada cavidade**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
B	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
C	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
D	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
E	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
F	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
G	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
H	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM

[106] Depois do tampão de equilíbrio único ser adicionado a cada cavidade, uma mistura de Myo-029 e agregado foi adicionada a cada cavidade. O nível de agregado no desafio da carga foi de 25%. Os constituintes de tampão foram mantidos no mesmo nível como durante o equilíbrio. O material foi agitado durante 20 minutos, deixando alcançar o equilíbrio. O sobrenadante foi removido de cada cavidade da placa de filtro. Outro estágio de adição da preparação de anticorpo foi feita, e a placa agitada, e o sobrenadante removido. Até sete estágios foram realizados. A proteína que não tinha se ligado em cada estágio foi analisada para determinar a concentração de proteína global (por absorbância a A280 nM). A quantidade de monômero e agregado foi

medida por HPLC de exclusão do tamanho. Qualquer diminuição no agregado indica uma condição que conduz à purificação. Tabelas 13 e 14 mostram a porcentagem do agregado e monômero, por cavidade, um uma poça dos primeiros quatro estágios.

**Tabela 13. Nível de agregado (%)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8%	6%	3%	4%	7%	16%	3%	3%	3%	5%	3%	3%
B	12%	15%	17%	3%	3%	5%	3%	4%	4%	6%	5%	5%
C	7%	6%	3%	4%	4%	3%	5%	4%	4%	6%	6%	4%
D	13%	14%	14%	6%	4%	7%	5%	6%	4%	8%	8%	7%
E	11%	10%	6%	4%	19%	11%	5%	6%	7%	9%	8%	6%
F	15%	19%	20%	4%	3%	10%	6%	8%	10%	10%	10%	17%
G	10%	9%	6%	6%	3%	7%	8%	14%	17%	10%	16%	22%
H	16%	18%	20%	4%	5%	17%	9%	15%	17%	12%	17%	18%

**Tabela 14. Recuperação do monômero (%)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51%	44%	24%	3%	3%	2%	43%	34%	25%	53%	32%	11%
B	64%	70%	78%	4%	24%	43%	42%	40%	38%	57%	42%	44%
C	49%	43%	27%	4%	6%	23%	60%	62%	62%	58%	60%	48%
D	65%	68%	75%	5%	35%	54%	61%	64%	64%	63%	63%	62%
E	61%	58%	44%	3%	3%	5%	58%	62%	64%	66%	65%	63%
F	70%	76%	88%	5%	33%	63%	59%	63%	68%	67%	68%	74%
G	57%	57%	50%	4%	7%	65%	72%	82%	85%	70%	80%	83%
H	71%	75%	85%	5%	48%	75%	69%	82%	88%	71%	80%	87%

[107] A triagem de elevada produção foi capaz de prever, qualitativamente, a recuperação de monômero e a remoção de HMWA em um esquema de purificação em coluna. Por exemplo, as condições de cavidade C8 (20 mM de HEPES, 1 mM de fosfato, 1750 mM de NaCl, e 12 mM de arginina, pH 7,2) foram testadas em uma coluna compactada com resina de cHA do tipo I. Os níveis de agregados foram reduzidos a 2,5% e o rendimento do monômero foi de 72%, após purificação na coluna. As condições de cavidade D5 (20 mM de HEPES, 5 mM de fosfato, 100 mM de NaCl, e 120 mM de arginina, pH 7,2) também foram testadas em uma coluna compactada com resina de cHA-1. Os níveis de agregados foram reduzidos a 0,7% e o rendimento do monômero foi de 73%, após a purificação em coluna. Finalmente, as condições equivalentes à cavidade C3 (100 mM de HEPES, 1 mM de fosfato, 120 mM de NaCl, e 200 mM de arginina, pH 7,2, onde o nível elevado de HEPES contribui para a resistência iônica similarmente ao NaCl), foram testadas em uma coluna compactada com resina de

CHA-1. Os níveis de agregados foram reduzidos a 4%, com uma recuperação de monômero de 69%, após a purificação em coluna. Estes resultados demonstram que a triagem de elevada produção subestima o desempenho da coluna, como medido tanto por recuperação de monômeros como remoção de HMWA. No entanto, uma triagem de elevada produção é capaz de prever de modo qualitativo tanto o rendimento como a pureza.

[108] Todas as referências aqui citadas são incorporadas aqui por referência em sua totalidade e para todos os fins na mesma extensão como se cada publicação ou patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado a ser incorporado por referência em sua totalidade para todos os fins. Na extensão em que as publicações e patentes ou pedidos de patente incorporados por referência contradizem a descrição contida neste relatório, o relatório se destina a superoutorgar e/ou ter uma prioridade com relação a este material contraditório.

[109] Todos os números expressando quantidades de ingredientes, condições de reação e assim em diante, usados no relatório e reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". Conseqüentemente, salvo indicado em contrário, os parâmetros numéricos configurados no relatório e reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas procuradas a serem obtidas pela presente invenção. Por último, e não como uma tentativa para limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser construído à luz do número de dígitos significantes e abordagens de arredondamento comuns.

[110] Muitas modificações e variações desta invenção podem ser feitas sem sair de seu espírito e escopo, como será evidente para os versados na técnica. As modalidades específicas descritas aqui são

oferecidas a título de exemplo apenas e não devem significar limitar a mesma em qualquer modo. Pretende-se que o relatório e os exemplos sejam considerados como exemplares apenas, com um escopo verdadeiro e espírito da invenção sendo indicados pelas seguintes reivindicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar pelo menos um monômero de anticorpo a partir de uma preparação de anticorpo contendo agregados de elevado peso molecular, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contatar uma resina de hidroxiapatita em uma coluna com uma preparação de anticorpos, por meio do qual o anticorpo contido na preparação se liga à resina, em que a coluna é equilibrada com um tampão de equilíbrio tendo um pH de 6,4 a 7,4 e compreendendo de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0 a 200 mM de NaCl, e,

- opcionalmente lavar a coluna com um tampão de lavagem que tem um pH de 6,4 a 7,4 e compreende de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0 a 200 mM de NaCl, e,

- eluir o anticorpo purificado da resina com pelo menos um tampão de eluição tendo um pH de 6,4 a 7,6 e compreendendo de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0,2 a 2,5 M de NaCl.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda submeter a preparação de anticorpos a (a) cromatografia de afinidade de Proteína A, e (b) cromatografia de troca iônica.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de afinidade de Proteína A é realizada primeiro e a cromatografia de hidroxiapatita é realizada por último.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de hidroxiapatita compreende:

- contatar a resina de hidroxiapatita em uma coluna com a preparação de anticorpos, em que a coluna é equilibrada em uma primeira etapa com um tampão de equilíbrio tendo um pH de 6,4 a 7,4

e compreendendo de 10 a 500 mM de fosfato de sódio e 1 M de NaCl, e, em uma segunda etapa com um tampão de equilíbrio tendo um pH de 6,4 a 7,4 e compreendendo de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0 a 200 mM de NaCl, e,

- opcionalmente lavar a coluna com um tampão de lavagem que tem um pH de 6,4 a 7,4 e compreende de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0 a 200 mM de NaCl, e,

- eluir o anticorpo purificado da resina com pelo menos um tampão de eluição tendo um pH de 6,4 a 7,6 e compreendendo de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0,2 a 2,5 M de NaCl.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de hidroxapatita compreende a etapa de lavar a coluna com um tampão de lavagem que tem um pH de 6,4 a 7,4 e compreende de 1 a 20 mM de fosfato de sódio e de 0 a 200 mM de NaCl.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo purificado contém menos que 5% de agregados de elevado peso molecular.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o tampão de eluição contém 3 mM ou 5 mM de fosfato de sódio.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o tampão de eluição contém 0,3 M a 2,5 M de NaCl.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o tampão de eluição contém 0,3 M a 1,1 M de NaCl.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o tampão de eluição contém 0,35 M a 1 M de NaCl.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG, IgA, IgD, IgE, ou IgM.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado, ou um fragmento do mesmo.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo receptor anti-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, ou anti-IL-22.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo tem um pI básico.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a resina é hidroxiapatita cerâmica tipo I ou tipo II.

16. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a cromatografia de troca iônica é cromatografia de troca aniônica.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo purificado contém menos que 300 ppm de Proteína A.

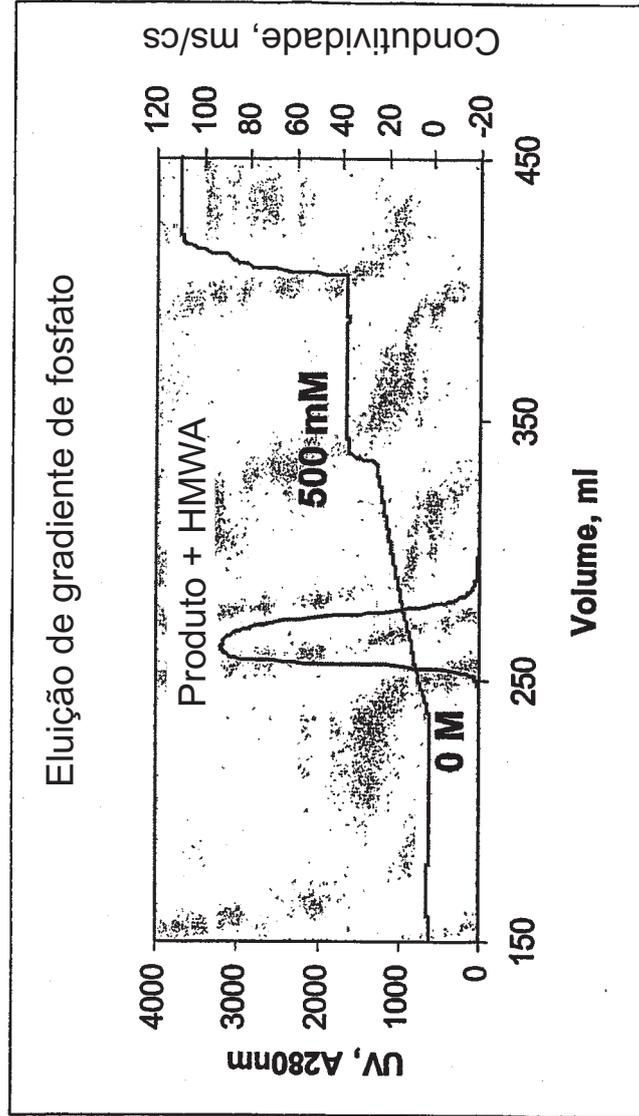


FIG 1

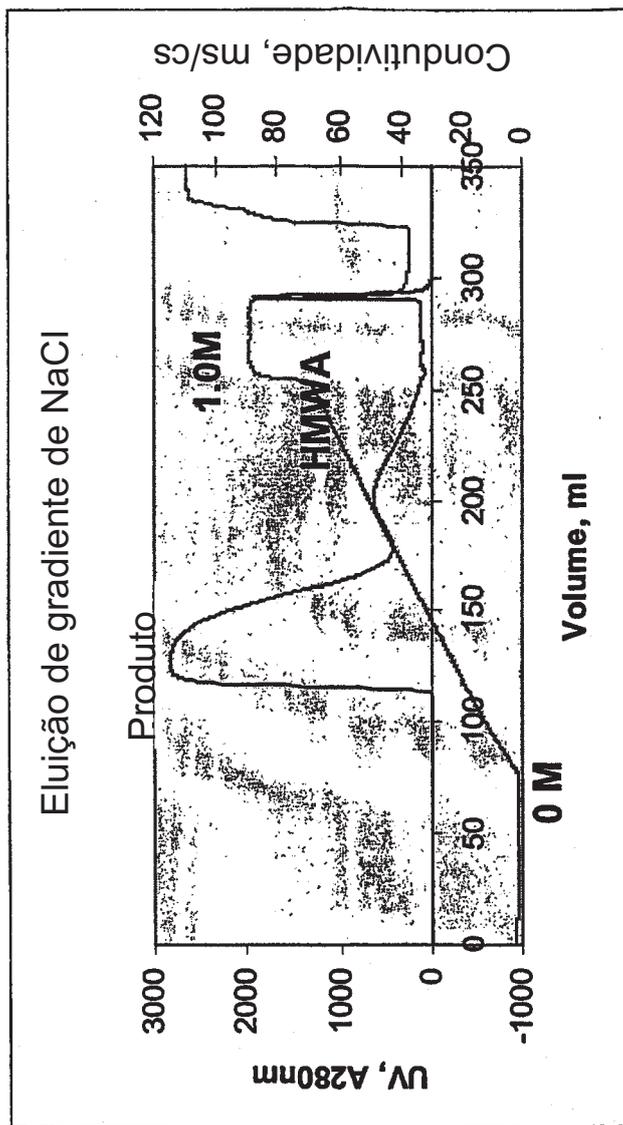


FIG 2

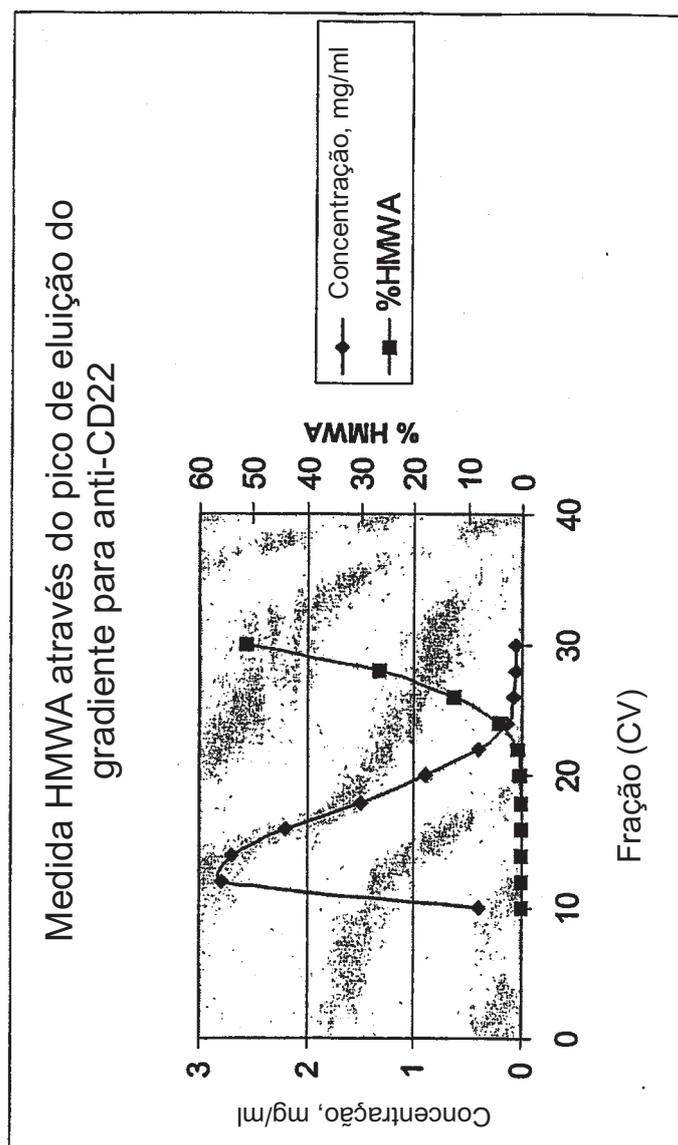


FIG 3

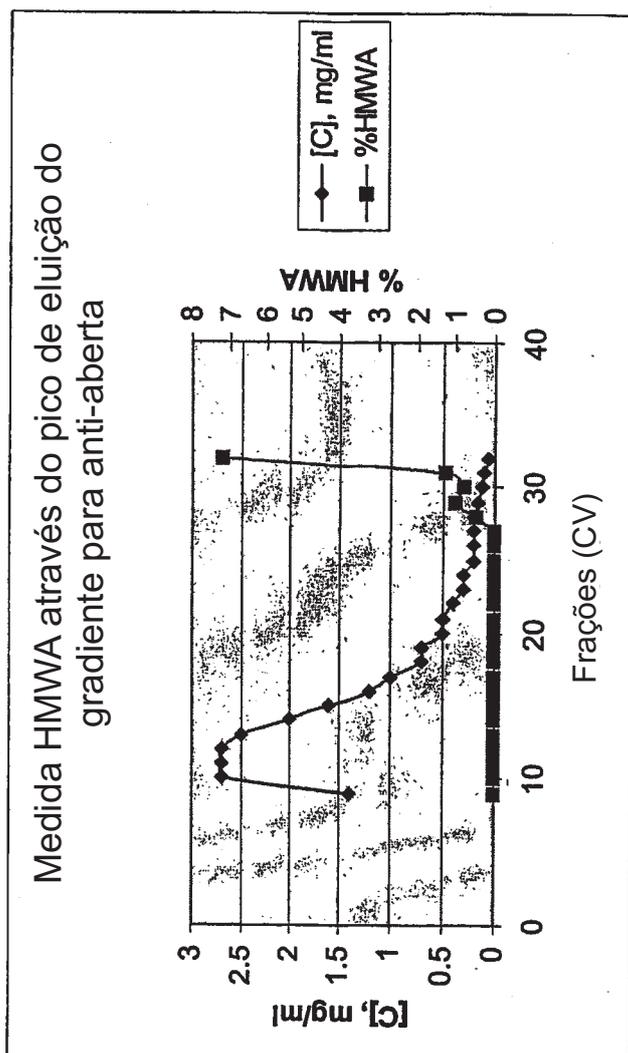


FIG 4