

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 264**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2018** **PCT/EP2018/073345**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19043096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2018** **E 18758897 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025** **EP 3676280**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de anticuerpos anti-receptor de IL-6**

30 Prioridad:

30.08.2017 EP 17188660

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2025

73 Titular/es:

FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH
(100.00%)

Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg, DE

72 Inventor/es:

SUTTER, HARRY-JAMES y
LE SAOUT, XAVIER

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 021 264 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de anticuerpos anti-receptor de IL-6

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar anticuerpos anti-receptor de IL-6 a partir de una muestra que comprende dichos anticuerpos e impurezas, mediante el uso de un procedimiento de tres columnas cromatográficas, según se define en las reivindicaciones, que incluye una cromatografía sobre resina que contiene fluorapatita. También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos purificados obtenibles mediante el procedimiento de la presente invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Cuando se produce un anticuerpo para uso terapéutico, es importante eliminar las impurezas relacionadas con el proceso, ya que pueden ser tóxicas. Las impurezas relacionadas con el proceso suelen consistir en HCP (proteínas de la célula huésped, *host cell proteins*), ADN y rPA (proteína A residual, *residual protein A*). Las HCP son una fuente importante de impurezas y pueden representar un serio desafío debido a su alta complejidad y heterogeneidad en masa molecular, punto isoeléctrico y estructura. Por lo tanto, es necesario contar con anticuerpos terapéuticos que muestren niveles muy bajos de HCP: se debe hacer especial hincapié en la optimización de las técnicas para reducir las HCP durante el proceso posterior (es decir, el proceso de purificación). Además, el proceso posterior debe adaptarse de tal manera que cumpla con la calidad producida por el proceso anterior correspondiente. Las impurezas relacionadas con el producto, tales como agregados y fragmentos de anticuerpos, también deben reducirse a un nivel mínimo para cualquier tipo de anticuerpo terapéutico.

[0003] Existe la necesidad de encontrar una secuencia de purificación óptima que garantice la eliminación general de las impurezas relacionadas con el producto y el proceso de acuerdo con criterios de calidad, al tiempo que minimiza la pérdida de proteínas debido al proceso de purificación.

[0004] El documento WO 2015/07068 describe el aislamiento y purificación de anticuerpos. El documento WO 2009/126603 describe la purificación por cromatografía de anticuerpos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] La presente invención se define en las reivindicaciones independientes y ciertas características opcionales de la misma se definen en las reivindicaciones dependientes. La información técnica que se presenta a continuación puede, en algunos aspectos, exceder el alcance de la invención, que se define exclusivamente en las reivindicaciones adjuntas. Esta información técnica adicional se proporciona para situar la presente invención en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. En la medida en que se utilicen los términos «invención», «ejemplo» y «realización», estos se interpretarán de forma que la protección no exceda el alcance de las reivindicaciones.

[0006] En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para purificar un anticuerpo anti-receptor de IL-6 a partir de una muestra que contiene el anticuerpo a purificar e impurezas, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo anti-receptor de IL-6 y las impurezas con un material de cromatografía de proteína A en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de las impurezas no se una a la resina; (b) eluir el anticuerpo del material de cromatografía de proteína A para obtener un eluato; (c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina; (d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el eluato de la etapa (b); (e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxiapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y (f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d). En otro aspecto, la presente invención también da a conocer un procedimiento para obtener un anticuerpo anti-receptor de IL-6 en forma monomérica, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo en forma monomérica, forma agregada y/o forma fragmentada con un material de cromatografía de proteína A en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y la forma fragmentada no se una a la resina; (b) eluir el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de proteína A para obtener un eluato; (c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y la forma fragmentada restante se una a la resina; (d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y la

forma fragmentada menor que el eluato de la etapa (b), (e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo en forma monomérica de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y la forma fragmentada restante se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxiapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y (f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y la forma fragmentada menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d).

[0007] En un aspecto, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 que se purifica según la presente invención es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano. Preferiblemente, es tocilizumab.

[0008] Los soportes de modo mixto de la presente invención presentan una combinación de dos o más de las siguientes funcionalidades: tales como intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlace de hidrógeno, enlace pi-pi y afinidad metálica. Preferiblemente, el soporte de modo mixto para la etapa (c) se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en intercambio catiónico y aniónico, tal como Capto-MMC y Capto-Adhere, y el soporte de modo mixto de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en hidroxifluorapatita o fluorapatita.

[0009] Los inventores han identificado que los procedimientos de la presente invención mantienen ventajosamente las impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, agregados y fragmentos de anticuerpos) y las impurezas relacionadas con el proceso, tales como las proteínas de la célula huésped, los niveles de ADN y el PA residual, dentro de intervalos aceptables. Los procedimientos de la presente invención también evitan ventajosamente la pérdida sustancial de producto y, por lo tanto, permiten la purificación de anticuerpos de alta calidad con un alto rendimiento.

DEFINICIÓN

[0010] El término "anticuerpo", y su forma plural "anticuerpos", incluye, entre otros, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como F(ab')₂, fragmentos proteolíticos de Fab y fragmentos de región variable monocatenaria (scFv). También se incluyen anticuerpos intactos modificados genéticamente o fragmentos, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos o completamente humanos, fragmentos scFv y Fab, así como péptidos y polipéptidos sintéticos de unión a antígeno.

[0011] El término "anticuerpo anti-receptor de IL-6" o "anticuerpo anti-IL-6R" se refiere a un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, que se une al receptor de IL-6. El "anticuerpo anti-receptor de IL-6" es preferiblemente un anticuerpo monoclonal humanizado; preferiblemente tocilizumab. La cadena ligera de tocilizumab contiene una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID No. 1 y la cadena pesada de tocilizumab contiene una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID No. 2.

[0012] El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que es un clon de una célula parental única.

[0013] El término inmunoglobulina "humanizada" (o "anticuerpo humanizado") se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de estructura humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (generalmente un ratón o una rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la estructura se denomina "acceptora" (humanización mediante el injerto de CDR no humanas sobre las regiones de estructura y constantes humanas, o mediante la incorporación de todos los dominios variables no humanos sobre las regiones constantes humanas (quimerización). No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90%, preferiblemente aproximadamente un 95% o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR y algunos residuos en la región constante de la cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. A través de anticuerpos humanizantes, se puede aumentar la semivida biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos.

[0014] El término inmunoglobulina "completamente humana" (o anticuerpo "completamente humano") se refiere a una inmunoglobulina que comprende tanto una región de estructura humana como CDR humanas. No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero de estarlo, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90 %, preferiblemente aproximadamente un 95 % o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina completamente humana, excepto posiblemente algunos residuos en la región constante de la cadena pesada si se requiere la modulación de las funciones efectoras o las propiedades farmacocinéticas, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. En algunos casos, se pueden introducir mutaciones de aminoácidos en las CDR, las regiones de estructura o la región constante para mejorar la afinidad de

unión y/o reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades bioquímicas/biofísicas del anticuerpo.

[0015] El término "anticuerpo recombinante" (o "inmunoglobulina recombinante") significa un anticuerpo producido mediante técnicas recombinantes. Las células huésped recombinantes para la producción de anticuerpos incluyen células procariotas y eucariotas recombinantes; preferiblemente, células huésped de mamíferos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) (incluidas las células CHO-S o CHO-k1). Por lo tanto, el término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo producido en células recombinantes (por ejemplo, de mamíferos). Dada la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos presentes en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son numerosas y van desde la modificación de solo uno o varios aminoácidos hasta el rediseño completo, por ejemplo, del dominio variable o la región constante. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, para mejorar, reducir o alterar características, tales como la fijación del complemento (por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento, CDC), la interacción con los receptores Fc y otras funciones efectoras (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC), propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, unión al receptor Fc neonatal; FcRn). Los cambios en el dominio variable se realizarán para mejorar las características de unión al antígeno. Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de otras formas que incluyen, por ejemplo, monóclonales o Fv, Fab y (Fab')₂, así como dímeros, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multispecíficos.

[0016] El término "parte de anticuerpo" se refiere a un fragmento de una cadena intacta o de longitud completa de un anticuerpo, normalmente la región de unión o variable. Dichas partes o fragmentos deben mantener al menos una actividad de la cadena intacta/anticuerpo; es decir, son "partes funcionales" o "fragmentos funcionales". Si mantienen al menos una actividad, preferiblemente mantienen la propiedad de unión a la diana. Ejemplos de partes de anticuerpo (o fragmentos de anticuerpo) incluyen, pero sin limitación, "Fv monóclonales", "anticuerpos monóclonales", "Fv" o "scFv". Estos términos se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios variables de las cadenas pesada y ligera, pero carecen de las regiones constantes, todo dentro de una única cadena polipeptídica. Generalmente, un anticuerpo monóclonal comprende además un enlace polipeptídico entre los dominios VH y VL, lo que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. En realizaciones específicas, los anticuerpos monóclonales también pueden ser bispecíficos y/o humanizados.

[0017] Un "fragmento Fab" se compone de una cadena ligera y los dominios variable y CH1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab" que contiene una cadena ligera y una cadena pesada, y que contiene más de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas, se denomina molécula F(ab')₂. Una "F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas. Tras definir algunos términos importantes, es posible ahora centrarse en realizaciones particulares de la presente invención.

[0018] El término "tampón" se utiliza según la técnica. Un "tampón de equilibrado" es un tampón utilizado para preparar la resina cromatográfica para recibir la muestra a purificar. Un "tampón de carga" se refiere al tampón utilizado para cargar la muestra en la columna cromatográfica o en un filtro. Un "tampón de lavado" es un tampón utilizado para lavar la resina. Dependiendo del modo de cromatografía, el "tampón de lavado" permitirá la eliminación de impurezas (en modo de unión/elución) o la recogida de la muestra purificada (en modo de flujo continuo). Un "tampón de elución" se refiere al tampón utilizado para separar la muestra del material de cromatografía. Esto es posible gracias al cambio de fuerza iónica entre los tampones de carga/lavado y el tampón de elución. La muestra purificada que contiene el anticuerpo se recogerá por tanto como eluato.

[0019] El término "resina" o "material cromatográfico" se refiere a cualquier fase sólida que permita la separación de las impurezas de la molécula a purificar. Dicha resina o material cromatográfico puede ser una resina/material cromatográfico de afinidad, aniónico, catiónico, hidrófobo o de modo mixto, según se define en las reivindicaciones.

[0020] Las unidades, prefijos y símbolos se utilizan de acuerdo con las normas, es decir, el Sistema Internacional de Unidades (SI).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. General

[0021] Los inventores descubrieron que el uso de la secuencia "cromatografía de proteína A" seguida de una primera "cromatografía de modo mixto" en flujo continuo seguida de una segunda "cromatografía en modo mixto" también en flujo continuo permite, entre otros, reducir, en una muestra de anticuerpos, la cantidad de especies de alto peso molecular tales como agregados, y/o especies de bajo peso molecular, tales como fragmentos de anticuerpos, al tiempo que se mantienen las proteínas de la célula huésped (HCP) en intervalos aceptables.

[0022] Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 que se purifican según el procedimiento de la presente invención suelen

ser secretados por células huésped recombinantes al medio de cultivo, del cual pueden recuperarse. La muestra de anticuerpos que se purifican según el procedimiento de la presente invención se obtiene preferiblemente (por ejemplo, del medio de cultivo) en el momento de la recogida o después de la recogida, si se conserva durante un tiempo determinado antes de la purificación. Por lo tanto, en un aspecto, los procedimientos de la presente invención comprenden la etapa de obtener una muestra de anticuerpos anti-receptor de IL-6 para purificar. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de la recogida en bruto, una muestra de la recogida depurada o una muestra después de la recogida, opcionalmente equilibrada en una solución acuosa tamponada.

[0023] Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para purificar un anticuerpo anti-receptor de IL-6 (anti-IL-6R) a partir de una muestra que contiene el anticuerpo e impurezas, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo y las impurezas con un material de cromatografía de afinidad en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de las impurezas no se una a la resina; (b) eluir el anticuerpo del material de cromatografía de afinidad para obtener un eluato; (c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina; (d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el eluato de la etapa (b); (e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y (f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d). En el contexto de la presente invención en su conjunto, las impurezas se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende o consiste en agregados del anticuerpo anti-receptor de IL-6 o fragmentos de dicho anticuerpo o mezclas de los mismos, una o más de proteínas de células huésped, endotoxinas, virus, moléculas de ácido nucleico, lípidos, polisacáridos y cualquier combinación de los mismos.

[0024] En un segundo aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para obtener un anticuerpo anti-receptor de IL-6 en una forma monomérica, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo en forma monomérica, forma agregada y/o forma fragmentada con un material de cromatografía de afinidad en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada no se una a la resina; (b) eluir el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de afinidad para obtener un eluato; (c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada restante se una a la resina; (d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y forma fragmentada menor que el eluato de la etapa (b); (e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo en forma monomérica de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada restante se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y (f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y forma fragmentada menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d).

[0025] El anticuerpo anti-receptor de IL-6 a purificar, según la presente invención, es preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que puede ser quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano. Preferiblemente, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal humanizado, preferiblemente tocilizumab. El anticuerpo monoclonal humanizado (por ejemplo, tocilizumab) se ha producido preferiblemente en células recombinantes de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (incluidas las células CHO-S o CHO-k1). Las líneas celulares (también denominadas "células recombinantes" o "células huésped") utilizadas en la presente invención se modifican genéticamente para expresar el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de interés. Los procedimientos y vectores para la modificación genética de células y/o líneas celulares para expresar dicho anticuerpo anti-receptor de IL-6 de interés son bien conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo, se ilustran diversas técnicas en Sambrook et al. (1989 y actualizaciones; [1]) o Ausubel et al. (1988 y actualizaciones; [2]). Las proteínas recombinantes (en este caso, anticuerpos anti-receptor de IL-6) suelen secretarse en el medio de cultivo del que se pueden recuperar. Las proteínas recuperadas pueden purificarse, o purificarse parcialmente, mediante procesos y productos conocidos disponibles en el mercado. Las proteínas purificadas pueden formularse entonces como composiciones farmacéuticas. Entre las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas se incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences (1995 y actualizaciones; [3]).

[0026] Normalmente, los procedimientos, según la presente invención, se realizan a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C), excepto la carga de la etapa (a) que normalmente se realiza entre 2 y 8 °C, ya que la muestra que contiene el anticuerpo a purificar (aquí un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de interés) normalmente se almacena en condiciones frías (entre 2 y 8 °C) después de la recogida según el procedimiento estándar (véase, por ejemplo, Horenstein et al., 2003; [4]).

[0027] Las impurezas que deben eliminarse en el contexto de la presente invención en su conjunto se seleccionan de al menos un grupo que consiste en agregados del anticuerpo (monoclonal) o fragmentos de dicho anticuerpo (monoclonal) o mezclas de los mismos, una o más de proteínas de la célula huésped, endotoxinas, virus, moléculas de ácido nucleico, lípidos, polisacáridos y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, la presente invención es para eliminar agregados y/o fragmentos de dicho anticuerpo (monoclonal).

[0028] La muestra recuperada de la etapa f), que comprende el anticuerpo purificado, comprende agregados a un nivel de al menos un 90 % menor que el nivel de agregados en la muestra de la etapa (a). De forma similar, dicha muestra recuperada contiene fragmentos a un nivel de al menos un 40 % menor que el nivel de fragmentos en la muestra de la etapa (a), y HCP a un nivel de al menos un 90 % menor o al menos un 95 % menor que el nivel de HCP en la muestra de la etapa (a) y por debajo del límite típico aceptable de 100 ppm (tal como menor a 50 ppm o 30 ppm).

B. Etapa de cromatografía de afinidad (etapas (a) y (b))

B.1. General

[0029] El término "cromatografía de proteína A" se refiere a la técnica de cromatografía de afinidad que utiliza proteína A, en la que la proteína A suele inmovilizarse en una fase sólida. La proteína A es una proteína de superficie que se encuentra originalmente en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Actualmente existen diversos tipos de proteína A de origen natural o producida por vía recombinante, que posiblemente también comprendan algunas mutaciones. Esta proteína tiene la capacidad de unirse específicamente a la parte Fc de inmunoglobulinas, tales como los anticuerpos IgG.

[0030] La cromatografía de proteína A es una de las técnicas de cromatografía de afinidad más comunes utilizadas para la purificación de anticuerpos. Normalmente, los anticuerpos de una solución a purificar se unen reversiblemente a la proteína A a través de su parte Fc. Por el contrario, (la mayoría de) las impurezas fluyen a través de la columna y se eliminan mediante etapas de lavado. Por lo tanto, los anticuerpos deben eluirse de la columna o de la resina de afinidad para recogerse para las siguientes etapas de purificación.

[0031] El material de cromatografía de proteína A de la etapa a), en el contexto de la presente invención en su conjunto, se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste, pero sin limitación, en MABSELECT™, MABSELECT™ SuRe, MABSELECT™ SuReLX, AMSPHERE™ A3, TOYOPEARL® AF-rProtein A-650F, TOYOPEARL® AF-HC, PROSEP®-vA, PROSEP®-vA Ultra, PROSEP® Ultra Plus o ESHMUNO-A®. En algunas realizaciones, el ligando de proteína A se inmoviliza en una matriz seleccionada del grupo que consiste en una matriz a base de dextrano, una matriz a base de agarosa, una matriz a base de poliestireno, una matriz a base de polivinilileto hidrófilo, una matriz a base de polimetacrilato rígido, una matriz a base de polímero poroso, una matriz a base de vidrio de poro controlado y cualquier combinación de las mismas. Alternativamente, el ligando de proteína A se inmoviliza en una membrana.

[0032] El propósito de esta etapa es capturar los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, tales como tocilizumab) presentes en la muestra (por ejemplo, una muestra de recogida depurada), concentrarlos y eliminar la mayoría de las impurezas relacionadas con el proceso (tales como HCP, ADN, componentes del caldo de cultivo celular).

B.2. Equilibrado y carga

[0033] En el contexto de la presente invención en su conjunto, la muestra que contiene el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de interés (por ejemplo, tocilizumab), que se pondrá en contacto con el material de cromatografía de afinidad en la etapa a), se encuentra en una solución acuosa. Puede ser una muestra de recogida en bruto, una muestra de recogida depurada o incluso una muestra preequilibrada en una solución acuosa tamponada. Antes de la purificación de la muestra, es necesario equilibrar el material de proteína A. Este equilibrado se realiza con una solución acuosa tamponada. Las soluciones acuosas tamponadas adecuadas (o tampones) incluyen, pero sin limitación, tampones de fosfato, tampones Tris, tampones de acetato y/o tampones de citrato. La solución acuosa tamponada para esta etapa se basa preferiblemente en acetato de sodio o fosfato de sodio. Preferiblemente, la solución tamponada está a una concentración en el intervalo de 10 mM o aproximadamente 10 mM a 40 mM o aproximadamente 40 mM y un pH en el intervalo de 6,5 o aproximadamente 6,5 a 8,0 o aproximadamente 8,0. Incluso preferiblemente, la solución tamponada se encuentra en una concentración en el intervalo de 15 mM o aproximadamente 15 mM a 30 mM o aproximadamente 30 mM (tal como entre 20 y 30 mM) y su pH en el intervalo de 6,8 o aproximadamente 6,8 a 7,5 o aproximadamente 7,5 (tal como entre 6,5 y 7,5). Incluso preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o de aproximadamente, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0 o 25,0 mM y su pH es de, o de aproximadamente, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 y 7,5.

[0034] La solución acuosa tamponada que se utilizará en uno de los procedimientos de la invención puede comprender además una sal en una concentración en el intervalo de, o de aproximadamente, 100 mM a o aproximadamente 200 mM, preferiblemente a una concentración en el intervalo de, o de aproximadamente, 125 a 180 mM, tal como de, o de aproximadamente, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165 o 170 mM. Preferiblemente, la sal es cloruro de sodio. En

un aspecto, la solución acuosa tamponada comprende fosfato de sodio en una concentración de entre 20 y 30 mM, una sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en una concentración de entre 100 y 200 mM, y/o tiene un pH en el intervalo de 6,5 a aproximadamente 7,5. Por ejemplo, la solución tamponada acuosa puede comprender fosfato de sodio en una concentración de o de aproximadamente 25 mM, cloruro de sodio en una concentración de o de aproximadamente 150 mM, y tiene un pH de o de aproximadamente pH 7,0 $\pm$ 0,2.

[0035] El experto en la materia seleccionará las condiciones adecuadas de equilibrado y carga para que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 a purificar, tal como tocilizumab, se una al material de cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de proteína A). De lo contrario, al menos una parte de las impurezas fluirán a través del material de cromatografía (es decir, no se unirá a la resina). Por ejemplo, la muestra (por ejemplo, muestra de recogida depurada) que contiene los anticuerpos a purificar puede cargarse en una cantidad de o de aproximadamente 35-40 g de anticuerpo por litro de material de cromatografía de afinidad empaquetado, tal como en una cantidad de aproximadamente 37-40 g de anticuerpo por litro de material de cromatografía de afinidad empaquetada, tal como en una cantidad de o de aproximadamente 37 g o 40 g de anticuerpo por litro de material de cromatografía de afinidad empaquetado.

B.3. Lavado

[0036] Tras la carga (paso (a)), el material de cromatografía de afinidad se lava una o dos veces con una cantidad mayor de la misma solución que el tampón de equilibrado, con una diferente, o con una combinación de ambas. Para la etapa de equilibrado y carga, las soluciones acuosas tamponadas adecuadas (o tampones) incluyen, pero sin limitación, tampones de fosfato, tampones Tris, tampones de acetato y/o tampones de citrato. El lavado es necesario para eliminar las impurezas no unidas.

[0037] Preferiblemente, el lavado se realiza en una sola etapa, es decir, con un solo tampón. Preferiblemente, el tampón de lavado es un tampón de acetato (tal como un tampón de acetato de sodio) con una concentración en el intervalo de 40 mM o aproximadamente 40 mM a 70 mM o aproximadamente 70 mM, y un pH en el intervalo de 5,0 o aproximadamente 5,0 a 6,0 o aproximadamente 6,0. Preferiblemente, la solución tamponada está a una concentración en el intervalo de 45 mM o aproximadamente 45 mM a 65 mM o aproximadamente 65 mM, y un pH en el intervalo de 5,2 o aproximadamente 5,2 a 5,8 o aproximadamente 5,8. Incluso preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o de aproximadamente, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 mM y su pH es de, o de aproximadamente, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7 y 5,8.

[0038] En una alternativa, el lavado se realiza en dos etapas con dos tampones diferentes. Preferiblemente, el primer tampón de lavado es un tampón de acetato (tal como un tampón de acetato de sodio) con una concentración en el intervalo de 40 mM o de aproximadamente 40 mM a 70 mM o aproximadamente 70 mM y un pH en el intervalo de 5,0 o aproximadamente 5,0 a 6,0 o aproximadamente 6,0. Incluso preferiblemente, la solución tamponada está a una concentración en el intervalo de 45 mM o aproximadamente 45 mM a 65 mM o aproximadamente 65 mM, y su pH en el intervalo de 5,2 o aproximadamente 5,2 a 5,8 o aproximadamente 5,8. Incluso preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o de aproximadamente, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 mM, y su pH es de, o de aproximadamente, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7 y 5,8. Preferiblemente, el segundo tampón de lavado es similar al tampón de equilibrado/carga. Por ejemplo, el segundo tampón de lavado es un tampón de fosfato (por ejemplo, fosfato sódico) en una concentración en el intervalo de 15 mM o aproximadamente 15 mM a 30 mM o aproximadamente 30 mM (tal como, entre 20 y 30 mM) y un pH en el intervalo de 6,8 o aproximadamente 6,8 a 7,5 o aproximadamente 7,5 (tal como, entre 6,5 y 7,5).

[0039] La solución tamponada acuosa que se utilizará en uno de los procedimientos de la presente invención puede comprender además una sal. Preferiblemente, si hay una sal presente y el procedimiento comprende dos etapas de lavado, dicha sal estará en mayor concentración en el primer tampón de lavado que en el segundo tampón lavado. Preferiblemente, la concentración de sal en el tampón de lavado (cuando solo se trata de una etapa) o en el primer tampón de lavado (cuando se trata de dos etapas), si la hay, está en una concentración en el intervalo de 1,0 M o aproximadamente 1,0 M a 2,0 M o aproximadamente 2,0 M, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 1,25 M o aproximadamente 1,25 a 1,80 M o aproximadamente 1,80 M, tal como de, o de aproximadamente, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65 o 1,70 M. Preferiblemente, la concentración de sal en el segundo tampón de lavado, si la hay, está a una concentración en el intervalo de 100 mM o aproximadamente 100 mM a 200 mM o aproximadamente 200 mM, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 125 mM o aproximadamente 125 a 180 mM o aproximadamente 180 mM, tal como de, o de aproximadamente, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165 o 170 mM. Las sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, sales de calcio y/o sales de magnesio. En un aspecto, la sal es cloruro de sodio.

[0040] El experto en la materia seleccionará las condiciones adecuadas para la etapa de lavado para que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 que se va a purificar, tal como el tocilizumab, permanezca unido al material de cromatografía de afinidad. De lo contrario, al menos una parte de las impurezas continuará fluyendo a través del material de cromatografía gracias a los tampones de lavado. Como ejemplo no limitante, con un lavado de 2 etapas, si el tampón de equilibrado comprende fosfato de sodio en una concentración de 25 mM o de aproximadamente 25 mM, una sal

(por ejemplo, NaCl) en una concentración de 150mM o de aproximadamente 150 mM y tiene un pH de $7,0 \pm 0,2$ o de aproximadamente $7,0 \pm 0,2$, se puede realizar un primer lavado con un tampón de lavado que comprende acetato (por ejemplo, acetato de sodio) (o fosfato) en una concentración de 55 mM o de aproximadamente 55 mM, una sal (por ejemplo, NaCl) en una concentración de 1,5 M o de aproximadamente 1,5 M y un pH de $5,5 \pm 0,2$ o de aproximadamente $5,5 \pm 0,2$, y se puede realizar un segundo lavado con un tampón de lavado idéntico al tampón de equilibrado.

B.4. Elución

[0041] El anticuerpo anti-receptor de IL-6, tal como tocilizumab, puede eluirse a continuación (etapa (b)) utilizando una solución (denominada tampón de elución) que interfiere con la unión del material de cromatografía de afinidad al dominio constante del anticuerpo que se va a purificar (en este caso, el anticuerpo anti-receptor de IL-6). Este tampón de elución puede incluir ácido acético, acetato de glicina, citrato o ácido cítrico. Preferiblemente, la solución tamponada es un tampón de ácido acético a una concentración en el intervalo de 40 mM o de aproximadamente 40 mM a 70 mM o aproximadamente 70 mM. Más preferiblemente, la solución tamponada está a una concentración en el intervalo de 45 mM o aproximadamente 45 mM a 65 mM o aproximadamente 65 mM. Aún más preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o de aproximadamente, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 mM, tal como un tampón de ácido acético a 55 mM. La elución puede realizarse reduciendo el pH del material de cromatografía y del anticuerpo unido al mismo. Por ejemplo, el pH del tampón de elución puede ser de 4,5 o de aproximadamente 4,5 o menos, o de 4,0 o de aproximadamente 4,0 o menos. Preferiblemente, es de 2,8 o aproximadamente 2,8 a 3,7 o aproximadamente 3,7, tal como 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5 o 3,6; por ejemplo, a un pH de $3,2 \pm 0,2$. El tampón de elución puede incluir opcionalmente un agente caotrópico.

[0042] El experto en la materia seleccionará las condiciones adecuadas para la etapa de elución para que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 que se va a purificar, tal como el tocilizumab, se libere del material de cromatografía de afinidad. A modo de ejemplo no limitativo, la elución (es decir, la elución de la etapa (b)) puede realizarse con un tampón de elución que comprende ácido acético a una concentración de 55 mM o de aproximadamente 55 mM y un pH de $3,2 \pm 0,2$.

C. Etapas de la cromatografía de modo mixto

C.1. General

[0043] El soporte de modo mixto, según la presente invención, se refiere a una fase sólida cromatográfica que implica una combinación de dos o más de las siguientes funcionalidades (sin limitarse a ellas): intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrofóbica, interacción hidrofílica, enlace de hidrógeno, enlace pi-pi o afinidad metálica, según se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, comprende dos tipos diferentes de ligandos. La fase sólida puede ser una partícula porosa, una partícula no porosa, una membrana o un monolito.

C.2. Primera cromatografía de modo mixto (etapas (c) y (d))

[0044] En el contexto de la presente invención en su conjunto, el material de cromatografía de modo mixto para la etapa (c) implica una combinación de dos o más de intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrofóbica, interacción hidrofílica y enlace de hidrógeno; preferiblemente, implica al menos intercambio aniónico. El soporte del modo mixto preferido para la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en Capto-MMC, Capto-Adhere, Capto-Adhere Impress, MEP Hypercel y ESHMUNO HCX. Preferiblemente, es Capto-Adhere, con propiedades de intercambio aniónico.

[0045] Preferiblemente, el eluato recuperado tras la cromatografía de afinidad (es decir, el eluato de la etapa (b)) se ajusta a un pH de 7,5 a 8,5, tal como 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5. La conductividad del eluato también puede ajustarse, tal como a o a aproximadamente 10-20 mS/cm, tal como a $15 \pm 0,5$ mS/cm. El ajuste puede realizarse, por ejemplo, con una solución concentrada de TRIS o NaOH; tal como, utilizando un tampón Tris 2 M. El objetivo es tener el eluato de la etapa (b) a un pH y una conductividad similares a los que se utilizan en la etapa (c). Si, por ejemplo, la etapa (c) se realiza a un pH de $8,0 \pm 0,2$, el eluato de la etapa (b) debe ajustarse a un pH de $8,0 \pm 0,2$. De igual manera, si la etapa (c) se realiza con una sal (por ejemplo, NaCl), se utilizarán las mismas condiciones de sal para el ajuste. Tal como se explica más adelante, el eluato (por ejemplo, tras el ajuste) puede someterse opcionalmente a una filtración en profundidad antes de cargarlo en el primer material de cromatografía de modo mixto.

[0046] Antes de cargar con el eluato (por ejemplo, eluato ajustado y/o filtrado en profundidad), el primer material de cromatografía de modo mixto se equilibra con una solución acuosa tamponada (tampón de equilibrado). Las soluciones acuosas tamponadas adecuadas (o tampones) incluyen, pero sin limitación, tampones de fosfato, tampones Tris, tampones de acetato y/o tampones de citrato. Preferiblemente, la solución tamponada es un tampón de fosfato (por ejemplo, fosfato sódico). La solución tamponada (por ejemplo, un tampón de fosfato sódico) se encuentra preferiblemente en una concentración en el intervalo de 20 mM o aproximadamente 20 mM a 60 mM o a aproximadamente 60 mM, y un pH en el intervalo de 7,5 o de aproximadamente 7,5 a 8,5 o a aproximadamente 8,5. Incluso preferiblemente, la solución tamponada se encuentra en una concentración en el intervalo de 30 mM o

aproximadamente 30 mM a 50 mM o a aproximadamente 50 mM, y su pH en el intervalo de 7,5 o de aproximadamente 7,5 a 8,5 o a aproximadamente 8,5. Incluso preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o de aproximadamente, 35,0, 36,0, 37,0, 38,0, 39,0, 40,0, 41,0, 42,0, 43,0, 44,0 o 45,0 mM y su pH es de, o de aproximadamente, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2 o 8,3.

[0047] La solución acuosa tamponada que se utilizará en uno de los procedimientos de la presente invención puede comprender además una sal en una concentración en el intervalo de 75 mM o de aproximadamente 75 mM a 125 mM o a aproximadamente 125 mM, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 85 o de aproximadamente 85 mM a 120 mM o de 85 a 110 mM, tal como de, o de aproximadamente de, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 mM. Entre las sales adecuadas se incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio y/o cloruro de potasio; preferiblemente cloruro de sodio. En un aspecto, el primer material de cromatografía de modo mixto se equilibra con un tampón de equilibrado que es una solución tamponada acuosa que comprende fosfato de sodio en una concentración entre 30 y 50 mM, una sal (por ejemplo, NaCl) en una concentración entre 80 y 120 mM y un pH en el intervalo de 7,5 a 8,5.

[0048] El tampón de equilibrado también se utilizará para "empujar" los anticuerpos/proteínas no unidos (anticuerpo anti-receptor de IL-6) en el flujo continuo, con el fin de recuperar dichos anticuerpos/proteínas purificados (etapa d).

[0049] En el contexto de la presente invención, el experto en la materia seleccionará las condiciones adecuadas para esta primera etapa de cromatografía de modo mixto para que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 a purificar, tal como tocilizumab, no se una al primer material de cromatografía de modo mixto, es decir, para que fluya a través del material de cromatografía. Dicho flujo continuo se recupera en el fondo de la columna. Por el contrario, al menos una parte de las impurezas se une al material de cromatografía. A modo de ejemplo no limitativo, el tampón de equilibrado para la primera etapa de cromatografía de modo mixto comprende fosfato de sodio a una concentración de o de aproximadamente 40 mM, cloruro de sodio a una concentración de o de aproximadamente 95 mM y un pH de $8,0 \pm 0,2$. La carga se realiza en las mismas condiciones. Por ejemplo, el primer material de cromatografía de modo mixto se puede cargar con eluato en una cantidad de 80 o de aproximadamente 80 a 120 g o a aproximadamente 120 g de anticuerpo anti-receptor de IL-6 (por ejemplo, tocilizumab) por litro de resina empaquetada; tal como en una cantidad de o de aproximadamente 110 g de anticuerpo por litro de resina empaquetada.

C.3. Segunda cromatografía de modo mixto (etapas (e) y (f))

[0050] En el contexto de la presente invención en su conjunto, el soporte de modo mixto para la segunda etapa de cromatografía de modo mixto (etapa (e)) se selecciona del grupo que consiste en un ligando (o resina) a base de hidroxiapatita, un ligando (o resina) a base de hidroxi fluorapatita o un ligando (o resina) a base de fluorapatita. Una resina a base de hidroxiapatita es un soporte de modo mixto que comprende un mineral de fosfato de calcio con la fórmula estructural $(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH})_2$. Sus modos de interacción dominantes son el intercambio catiónico de fosforilo y la afinidad por el calcio metálico. Las resinas a base de hidroxiapatita están disponibles comercialmente en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, formas compuestas cerámicas. Los ejemplos comerciales de hidroxiapatita cerámica incluyen, pero sin limitación, CHT™ Tipo I y CHT™ Tipo II. Las hidroxiapatitas cerámicas son partículas porosas y pueden tener varios diámetros, por ejemplo, aproximadamente de 20, 40 y 80 micrones.

[0051] Una resina a base de fluorapatita es un soporte de modo mixto que comprende un mineral fluorado insoluble de fosfato de calcio con la fórmula estructural $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ o $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$. Sus modos de interacción predominantes son el intercambio catiónico de fosforilo y la afinidad por el calcio metálico. Las resinas a base de fluorapatita se comercializan en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, formas compuestas cerámicas. Ejemplos comerciales están disponibles comercialmente en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, formas compuestas cerámicas. Los ejemplos comerciales de hidroxiapatita cerámica incluyen, pero sin limitación, CFT™ Tipo I y CFT™ Tipo II. Las hidroxiapatitas cerámicas son partículas porosas esféricas y pueden tener varios diámetros, por ejemplo, aproximadamente de 10, 20, 40 y 80 micrones.

[0052] Una resina a base de hidroxi fluorapatita es un soporte de modo mixto que comprende un mineral de fosfato de calcio hidroxilado insoluble y fluorado insoluble con la fórmula estructural $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_x(\text{F})_y$. Sus modos de interacción dominantes son el intercambio catiónico de fosforilo y la afinidad por el calcio metálico. La hidroxi fluorapatita se comercializa en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, formas cerámicas, cristalinas y compuestas. Las formas compuestas contienen microcristales de hidroxi fluorapatita atrapados dentro de los poros de agarosa u otras perlas. Un ejemplo de resina cerámica de hidroxi fluorapatita es la resina cerámica de hidroxi fluorapatita MPC™, con una fórmula estructural $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,5}(\text{F})_{0,5})$. Se basa en la resina de modo mixta de apatita cerámica Tipo I (40 μm).

[0053] Preferiblemente, el flujo continuo recuperado tras la primera cromatografía de modo mixto (es decir, el eluato de la etapa (d)) se ajusta a un pH de 7,0 a 8,5, tal como 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0. El ajuste puede realizarse, por ejemplo, con una solución concentrada de TRIS y/o NaOH. El objetivo es tener el flujo continuo de la etapa (d) en las condiciones adecuadas para la carga en la segunda cromatografía de modo mixto. Si, por ejemplo, la etapa (e) se realiza a un pH de $7,5 \pm 0,2$, el flujo continuo de la etapa (d) debe ajustarse a un pH de $7,5 \pm 0,2$. Esta etapa de ajuste puede realizarse junto con una etapa de concentración, tal como mediante filtración de flujo tangencial (FFT). En tal caso, puede añadirse una etapa de filtración antes de la segunda cromatografía de modo mixto. Otros

ajustes que son necesarios se relacionan con las sales (por ejemplo, NaCl) y NaPO_4 .

[0054] Antes de cargar con el flujo continuo opcionalmente ajustado y/o concentrado, el segundo material de cromatografía de modo mixto se equilibra con una solución acuosa tamponada (tampón de equilibrado). Preferiblemente, el flujo continuo recuperado tras la primera etapa de cromatografía de modo mixto (etapa (d)) se equilibra antes de cargarlo en el segundo material de cromatografía de modo mixto (de la etapa (e)) con una solución acuosa tamponada. Las soluciones acuosas tamponadas adecuadas (o tampones) incluyen, pero sin limitación, tampones de fosfato, tampones Tris, tampones de acetato y/o tampones de citrato. Preferiblemente, la solución tamponada es un tampón de fosfato (por ejemplo, fosfato sódico). La solución tamponada (por ejemplo, un tampón de fosfato sódico) se encuentra preferiblemente en una concentración en el intervalo de 1 mM o aproximadamente 1 mM a 20 mM o a aproximadamente 20 mM, y un pH en el intervalo de 7,0 o aproximadamente 7,0 a 8,0 o a aproximadamente 8,0. Más preferiblemente, la solución tamponada está a una concentración en el intervalo de 2 mM o aproximadamente 2 mM a 15 mM o aproximadamente 15 mM, y su pH está en el intervalo de 7,2 o aproximadamente 7,2 a 7,8 o aproximadamente 7,8. Aún más preferiblemente, la concentración de la solución tamponada es de, o aproximadamente de, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 mM, y su pH es de, o de aproximadamente, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 y 7,8.

[0055] La solución acuosa tamponada que se utilizará en uno de los procedimientos de la presente invención puede comprender además una sal en una concentración en el intervalo de 100 mM a 250 mM o de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, preferiblemente a una concentración en el intervalo de 130 o de aproximadamente 130 mM a 200 mM, tal como de o de aproximadamente 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190 o 195 mM. Las sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio y/o cloruro de potasio; preferiblemente, cloruro de sodio. En un aspecto, el segundo material de cromatografía de modo mixto se equilibra con un tampón de equilibrado que es una solución tamponada acuosa que comprende fosfato de sodio en una concentración entre 1 y 10 mM, opcionalmente una sal (por ejemplo, NaCl) en una concentración entre 130 y 200 mM, y un pH en el intervalo de 7,0 a 8,0.

[0056] El tampón de equilibrado también se utilizará para "empujar" los anticuerpos/proteínas no unidos en el flujo continuo, con el fin de recuperar dichos anticuerpos/proteínas purificados (etapa f).

[0057] En el contexto de la presente invención, el experto en la materia seleccionará las condiciones adecuadas para esta segunda etapa de cromatografía de modo mixto para que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 a purificar, tal como tocilizumab, no se una al primer material de cromatografía de modo mixto, es decir, para que fluya a través del material de cromatografía. Dicho flujo continuo se recupera en el fondo de la columna. Por el contrario, al menos una parte de las impurezas se une al material de cromatografía. A modo de ejemplo no limitativo, la segunda etapa de cromatografía de modo mixto puede realizarse en una solución acuosa tamponada que comprende fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 170 mM y un pH de $7,5 \pm 0,2$. La carga se realiza en las mismas condiciones. Por ejemplo, el segundo material de cromatografía de modo mixto puede cargarse con eluato en una cantidad de al menos 60 g de anticuerpo anti-receptor de IL-6 (por ejemplo, tocilizumab) por litro de resina empaquetada; tal como, en una cantidad de aproximadamente 60 g de anticuerpo por litro de resina empaquetada. En una realización, el segundo material de cromatografía de modo mixto puede cargarse con eluato en una cantidad de 80 o de aproximadamente 80 a 120 g o a aproximadamente 120 g de anticuerpo anti-receptor de IL-6 (por ejemplo, tocilizumab) por litro de resina empaquetada; por ejemplo, en una cantidad de 110 o de aproximadamente 110 g de anticuerpo por litro de resina empaquetada.

D. Posibles etapas adicionales

D.1. Inactivación del virus

[0058] Opcionalmente, el procedimiento, según la presente invención, comprende una etapa de inactivación del virus. Esta etapa se realiza preferiblemente entre la etapa de cromatografía de afinidad (tras la elución del anticuerpo) y la primera etapa de cromatografía de modo mixto. Se denomina etapa (b'). Para inactivar el virus, el eluato recuperado tras la cromatografía de afinidad (es decir, el eluato de la etapa (b)) se ajusta con una solución acuosa ácida concentrada. El pH que debe alcanzarse durante el ajuste se encuentra preferiblemente en un intervalo de 3,0 o de aproximadamente 3,0 a 4,5 o a aproximadamente 4,5, incluso preferiblemente en un intervalo de 3,2 o de aproximadamente 3,2 a 4,0 o a aproximadamente 4,0, tal como 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0; típicamente $\text{pH } 3,5 \pm 0,2$. La concentración de sal en la solución acuosa ácida utilizada para el ajuste es de 1,5 o de aproximadamente 1,5 a 2,5 o a aproximadamente 2,5. Preferiblemente, la concentración de sal en la solución acuosa ácida es de 1,7 o de aproximadamente 1,7 a 2,3 o aproximadamente 2,3, tal como 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2 o 2,3 M. La solución acuosa ácida preferida es ácido acético, tal como a una concentración de 2 M o de aproximadamente 2 M. En un aspecto, el eluato se ajusta a $\text{pH } 3,5 \pm 0,2$ utilizando ácido acético 2 M. El eluato ajustado resultante se incuba típicamente durante aproximadamente 60 ± 15 min.

[0059] Al final de la incubación, el material se neutraliza entonces con una solución acuosa neutra concentrada. El pH que se debe alcanzar durante la neutralización se encuentra preferiblemente en un intervalo de 4,5 o de aproximadamente 4,5 a 6,5 o a aproximadamente 6,5, si la muestra neutralizada se mantiene antes de la etapa (c), o

incluso preferiblemente en un intervalo de 4,8 o de aproximadamente, 4,8 a 5,6, tal como 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 o 5,6. Si la muestra neutralizada se utiliza directamente para la etapa (c), el pH que se debe alcanzar durante la neutralización será el mismo que el utilizado para la etapa (c), es decir, de 6,5 a 8,5 (por ejemplo, de 7,5 a 8,5, tal como un pH de $8 \pm 0,2$). La concentración de sal en la solución acuosa utilizada para la neutralización es de 1,0, o de aproximadamente, 1,0 a 2,5, o a aproximadamente, 2,5. Preferiblemente, la concentración de sal en la solución acuosa neutra es de 1,0, o de aproximadamente, 1,0 a 2,0 M, o a aproximadamente, 2,0 M, tal como, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 M. La solución acuosa neutra preferida es base Tris, tal como a 2 M. En un aspecto, el material inactivado del virus se neutraliza a pH $5,2 \pm 0,2$ utilizando base Tris 2 M.

D.2. Etapas de filtración opcionales

[0060] Se pueden añadir varias etapas de filtración al proceso de purificación. Dichas etapas pueden ser necesarias para eliminar aún más impurezas, pero también pueden utilizarse para concentrar la muestra que se va a purificar antes de la siguiente etapa cromatográfica o para cambiar el tampón antes de la siguiente etapa cromatográfica.

[0061] Por ejemplo, para reducir aún más las impurezas del eluato, o del eluato ajustado, después de las etapas (b) o (b'), se puede realizar una etapa de filtración justo antes de la primera cromatografía de modo mixto. Esta etapa de filtración se realiza preferiblemente con un filtro de profundidad. Dicha etapa puede realizarse en línea con la primera cromatografía de modo mixto.

[0062] Se puede incluir una etapa de filtración, tal como una filtración profunda, durante el proceso. Esta etapa puede añadirse, por ejemplo, justo antes de la primera cromatografía de modo mixto, tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0063] La filtración de flujo tangencial (FFT) también puede realizarse durante el procedimiento de purificación. Por ejemplo, si se desea concentrar el flujo continuo de la etapa (d) antes de cargarlo en la segunda cromatografía de modo mixto, se puede realizar una FFT justo antes de la etapa (e). Dicha etapa, si la hay, se denomina etapa (d'). Esta etapa de filtración puede realizarse con el tampón de equilibrado que se utilizará para la segunda cromatografía de modo mixto. Esto permitirá que el flujo continuo no solo se concentre, sino que también esté en una condición tal que esté listo para la siguiente etapa cromatográfica. A modo de ejemplo no limitativo, si la segunda cromatografía de modo mixto se realiza en una solución tamponada acuosa de fosfato de sodio 5 mM y cloruro de sodio 170 mM, pH $7,5 \pm 0,2$, la FFT puede realizarse en una solución tamponada acuosa que comprende fosfato de sodio 5 mM y cloruro de sodio 170 mM, pH $7,5 \pm 0,2$.

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA

[0064]

SEQ ID NO 1: cadena ligera de tocilizumab, secuencia de aminoácidos

SEQ ID NO 2: cadena pesada de tocilizumab, secuencia de aminoácidos

EJEMPLOS

I. Células, expansión celular y crecimiento celular

[0065] El anticuerpo anti-IL-6R utilizado en el ejemplo es tocilizumab (véanse las SEQ ID Nos.1-2). Se produjo en las células CHO-K1. Las células se cultivaron en un cultivo discontinuo alimentado. Se incubaron a $36,5^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 , 90% de humedad y se agitaron a 320 rpm. Cada uno de los cultivos discontinuos alimentados duró 14 días.

II. Procedimientos analíticos

[0066] Contenido de HCPs (ppm): el nivel de HCPs en ppm se calcula utilizando el nivel de HCPs determinado en ng/ml dividido por la concentración de mAb determinada por la absorbancia de UV (mg/ml).

[0067] Contenido de agregados (HMW-High molecular weight) (expresado en %): la evaluación se realizó por medio de SE-HPLC, utilizando un protocolo estándar.

[0068] Contenido de especies de bajo peso molecular (LMW-Low molecular weight) (expresado en %): la evaluación se realizó por medio de CE-SDS, utilizando un protocolo estándar.

Ejemplo 1 - Tocilizumab purificado de acuerdo con un procedimiento estándar

[0069] Se llevó a cabo el procedimiento de purificación completa a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$), con la excepción de la etapa de carga de la etapa de proteína A, debido a que la muestra de recogida depurada se almacenó a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes de la purificación.

[0070] El tocilizumab se purificó de acuerdo con las etapas de purificación estándares que incluyen una "cromatografía de la proteína A" seguida de una primera "cromatografía de intercambio de iones" en un eluato de unión, seguido de

una segunda "cromatografía de intercambio de iones" en el flujo continuo (también denominada etapa de pulido).

[0071] Con el uso de dicho procedimiento estándar, se obtuvieron los siguientes resultados:

Impurezas	Después de Proteína A	Después de primer IEX	Después de segundo IEX	Factor de purificación total
HCPs	250 ppm	50 ppm	5 ppm	50
HMW	1 %	0,6 %	0,6 %	1,7
LMW	2,8 %	3,1 %	3 %	0,9

5

Ejemplo 2 - Tocilizumab purificado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención

[0072] Se llevó a cabo el procedimiento de purificación completa a temperatura ambiente (15-25°C), con la excepción de la etapa de carga de la etapa de proteína A, debido a que la muestra recogida depurada se almacenó a temperatura fría antes de la purificación (es decir, a 2-8°C). El nuevo procedimiento de acuerdo con la presente invención se ha utilizado para mejorar el esquema de purificación para tocilizumab. Las principales etapas de este nuevo procedimiento eran:

- cromatografía de la proteína A,
- cromatografía de modo mixto 1,
- cromatografía de modo mixto 2.

Etapas de la proteína A (PUP)

[0073] La etapa de la proteína A se llevó a cabo en una resina Prosep Ultra Plus® (de Merck Millipore) con una altura de lecho objetivo de 20 ± 2 cm. Esta etapa se llevó bajo las siguientes condiciones:

1. Equilibrado: al menos ($\geq$) 5 volúmenes de lecho (BV) de una solución acuosa que comprende 25 mM de NaPI (fosfato de sodio) + 150 mM de NaCl, pH 7,0. Al final del equilibrado se comprobaron el pH y la conductividad del efluente. Deberían cumplir con las recomendaciones de pH y conductividad de $7,0 \pm 0,2$ y 18 ± 1 mS/cm, respectivamente, antes de que pueda comenzar la carga.
2. Carga: la muestra recogida depurada a una capacidad máxima de aproximadamente 35-40 g de tocilizumab/l de lecho empaquetado a una temperatura de 2-25°C.
3. Lavado I: ≥ 5 BV de una solución que comprende 55 mM de acetato de sodio, 1,5M de NaCl, pH 5,5.
4. Lavado II: ≥ 3 BV de una solución que comprende 25mM de NaPI + 150 mM de NaCl, pH 7,0.
5. Elución: la columna se eluyó con 55 mM de ácido acético pH 3,2. Se recogió el pico de eluato en cuanto la absorbancia a 280nm alcanzó 25 mUA/mm del camino óptico de celda de UV y se detuvo la recogida en cuanto la absorbancia a 280nm volvió a 25 mUA/mm del camino óptico de celda de UV. El volumen de eluato debería ser inferior a 4 BV.

Inactivación del virus a pH bajo

[0074] Se ajustó el eluato de la proteína A hasta un pH $3,5 \pm 0,2$ mediante la adición de una solución de ácido acético 2 M bajo agitación. Cuando se alcanzó el pH objetivo, se detuvo la agitación y el eluato acidificado se incubó durante 60 ± 15 minutos. Al final de la incubación, el material se neutralizó hasta un pH $5,2 \pm 0,2$ mediante la adición de una solución de base de Tris 2 M bajo agitación. El eluato resultante (eluato neutralizado) se puede almacenar durante como mínimo 3 meses a 2-8°C.

Cromatografía de modo mixto 1 (MM1)

[0075] El eluato neutralizado se ajustó hasta un pH $8,0 \pm 0,2$ con Tris 2 M y su conductividad aumentó hasta $15,0 \pm 0,5$ mS/cm con NaCl 3 M. A continuación, este eluato ajustado se sometió a una filtración de profundidad en línea con cromatografía de modo mixto en Capto Adhere® (de GE Healthcare) de la siguiente manera:

1. El filtro de profundidad (Millistack Pod de Merck Millipore) se conectó al sistema de purificación por delante de la columna de cromatografía.
2. Preequilibrado de la resina: ≥ 3 BV de 500 mM de NaPI, pH 7,5
3. Equilibrado de la resina: ≥ 6 BV de 40 mM de NaPI, 93 mM de NaCl, pH 8,0.
4. Carga del eluato ajustado a una capacidad de 80-120 g/l de tocilizumab/l de resina empaquetada (punto de ajuste: 110 g de tocilizumab/l de resina empaquetada). Inicio de la recogida del flujo continuo en cuanto la absorbancia a 280 nm alcance 12,5 mUA/mm del camino óptico de celda de UV.
5. Lavado: 4 BV de 40 mM de NaPI, 93 mM de NaCl, pH 8,0. Detener la recogida del flujo continuo que contiene el tocilizumab purificado.

Cromatografía de modo mixto 2 (MM2)

[0076] Antes de purificar adicionalmente con la cromatografía de modo mixto 2, el flujo continuo de la cromatografía de modo mixto 1 se concentró por medio de TFF, sobre una membrana de Pellicon 3 Ultracel® de 30kDa (de Merck Millipore). Esta etapa permitió también intercambiar el tampón bajo las condiciones adecuadas para la carga de la etapa de cromatografía con fluorapatita, en una fluorapatita cerámica CFT® del tipo II (40 µm) (de Bio-Rad).

[0077] La etapa de TFF se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Equilibrado del filtro (que comprende las dos líneas de fracción retenida y permeado) con un tampón que contiene 5 mM de NaPO₄, 170 mM de NaCl, tampón a pH 7,5.
2. Carga del flujo continuo de la cromatografía de modo mixto 1 a ≤ 500 g de tocilizumab/m²
3. Diafiltración con ≥ 9 DV del mismo tampón que para el equilibrado
4. Recuperación de la fracción retenida que contiene el tocilizumab purificado.

[0078] La etapa de cromatografía de modo mixto 2 se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Preequilibrado: ≥ 3 BV de 0,5M de NaPI, pH 7,50.
2. Equilibrado: ≥ 5 BV de 5 mM de NaPI, 170 mM de NaCl, pH 7,5
3. Carga de la fracción retenida de TFF a una capacidad de ≤ 60 g de tocilizumab/l de resina empaquetada Inicio de la recogida del flujo continuo en cuanto la absorbancia a 280 nm alcance 12,5 mUA/mm del camino óptico de celda de UV.
4. Lavado: ≥ 6 BV con 5 mM de NaPI, 170 mM de NaCl, pH 7,5. Detención de la recogida del flujo continuo que contiene el tocilizumab purificado.

[0079] Con el uso de dicho procedimiento nuevo, se obtuvieron los siguientes resultados:

Impurezas	Después de PUP	Después de MM1	Después de MM2	Factor de purificación total
HCPs	874 ppm	36,7 ppm	25,1 ppm	35
HMW	2,4 %	0,5 %	0,2 %	12
LMW	2,7 %	2,3 %	1,4 %	1,9

Conclusión

[0080] Los inventores descubrieron que utilizando el nuevo proceso de acuerdo con el ejemplo 2, mejoró la purificación de un anticuerpo anti-receptor IL-6 (tal como tocilizumab) en comparación con un proceso estándar (tal como se describe en el ejemplo 1). En particular era posible disminuir incluso más la cantidad de impurezas, tales como los agregados (contenido de HMW) y fragmentos (contenido de LMW), mientras se mantenía las HCPs en los intervalos aceptables.

REFERENCIAS

- [1] Sambrook et al., 1989 y actualizaciones, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press.
- [2] Ausubel et al., 1988 y actualizaciones, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Wiley & Sons, Nueva York.
- [3] Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995, 18 edición., Mack Publishing Company, Easton, PA.
- [4] Horensetein et al., 2003, Journal of Immunological Methods 275:99-112.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar un anticuerpo anti-receptor de IL-6 a partir de una muestra que contiene dicho anticuerpo e impurezas, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo y las impurezas con un material de cromatografía de proteína A en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de las impurezas no se una a la resina;

(b) eluir el anticuerpo del material de cromatografía de proteína A para obtener un eluato;

(c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina;

(d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el eluato de la etapa (b),

(e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo no se una a la resina y al menos una parte de las impurezas restantes se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita;

y

(f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de impurezas menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d).

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las impurezas se seleccionan entre al menos uno del grupo que consiste en agregados del anticuerpo anti-receptor de IL-6 o fragmentos de dicho anticuerpo o mezclas de los mismos, una o más proteínas de la célula huésped, endotoxinas, virus, moléculas de ácido nucleico, lípidos, polisacáridos y cualquier combinación de los mismos.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la muestra comprende el anticuerpo en forma monomérica e impurezas seleccionadas entre: agregados del anticuerpo, fragmentos del anticuerpo o mezclas de dichos agregados y fragmentos; y en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo y las impurezas con un material de cromatografía de proteína A en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y/o fragmentada no se una a la resina;

(b) eluir el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de proteína A para obtener un eluato;

(c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y/o fragmentada restante se una a la resina;

(d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y/o fragmentada menor que el eluato de la etapa (b),

(e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo en forma monomérica de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y/o fragmentada restante se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y

(f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y/o fragmentada menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d).

4. Procedimiento para obtener un anticuerpo anti-receptor de IL-6 en forma monomérica, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la muestra que contiene el anticuerpo en forma monomérica, forma agregada o forma fragmentada con un material de cromatografía de proteína A en condiciones tales que el anticuerpo se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada no se una a la resina;

(b) eluir el anticuerpo en forma monomérica del material de cromatografía de proteína A para obtener un eluato;

(c) cargar el eluato de la etapa (b) sobre un primer material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada restante se una a la resina;

(d) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y forma fragmentada menor que el eluato de la etapa (b),

(e) cargar el flujo continuo recuperado que contiene el anticuerpo en forma monomérica de la etapa (d) sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto en condiciones tales que el anticuerpo en forma monomérica no se una a la resina y al menos una parte de la forma agregada y forma fragmentada restante se una a la resina; en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona entre ligando a base de hidroxapatita, ligando a base de hidroxifluorapatita o ligando a base de fluorapatita; y

(f) recuperar el flujo continuo que contiene el anticuerpo en forma monomérica en condiciones tales que dicho flujo continuo recuperado contenga un nivel de la forma agregada y forma fragmentada menor que el flujo continuo recuperado de la etapa (d).

5 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 es tocilizumab.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se ha producido en células de mamíferos recombinantes.

10 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los materiales de cromatografía de modo mixto de la etapa (c) o (e) presentan una combinación de dos o más de las siguientes funcionalidades: intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlace de hidrógeno, enlace pi-pi y afinidad metálica.

15 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en Capto-MMC y Capto-Adhere; y el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en un ligando a base de hidroxifluorapatita o un ligando a base de fluorapatita.

20 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e) es un ligando de fluorapatita de CFT tipo I o CFT tipo II.

25 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra, que contiene el anticuerpo anti-receptor de IL-6, que se va a poner en contacto con el material de cromatografía de proteína A en la etapa a) está en una solución acuosa.

30 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de cromatografía de proteína A se equilibra, antes de la etapa (a), con una solución acuosa tamponada que comprende fosfato de sodio a una concentración de entre 20 y 30 mM, una sal a una concentración de entre 100 y 200 mM y un pH en el intervalo de 6,5 a aproximadamente 7,5.

35 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la elución de la etapa (b) se realiza con un tampón de elución que comprende ácido acético a una concentración entre 40 y 70 mM y a un pH en el intervalo de 3,0 a aproximadamente 3,5.

40 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, antes de cargar el eluato de la etapa (b) sobre el primer material de cromatografía de modo mixto de la etapa (c), el primer material de cromatografía de modo mixto se equilibra con una solución acuosa tamponada que comprende fosfato de sodio en una concentración de entre 30 y 50 mM, una sal en una concentración de entre 80 y 120 mM y un pH en el intervalo de 7,5 a aproximadamente 8,5.

45 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, antes de cargar el flujo continuo recuperado de la etapa (d) sobre el segundo material de cromatografía de modo mixto de la etapa (e), el segundo material de cromatografía de modo mixto se equilibra con una solución acuosa tamponada que comprende fosfato de sodio en una concentración de entre 1 y 10 mM, opcionalmente una sal en una concentración de entre 130 y 200 mM y un pH en el intervalo de 7,0 a aproximadamente 8,0.

50 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11, 13 y 14, en el que la sal es cloruro de sodio.