



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611600-0 A2**

(22) Data de Depósito: 16/06/2006
(43) Data da Publicação: 15/03/2011
(RPI 2097)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/00
A61K 39/395
C07K 16/18

(54) Título: **MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA, PROTEÍNA, E, KIT**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 60/691821

(73) Titular(es): WYETH

(72) Inventor(es): RANGANATHAN GODAVARTI, TIMOTHY ISKRA

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006023478 de 16/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/138553 de 28/12/2006

(57) Resumo: METODO PARA PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEINA, PROTEINA, E, KIT O presente pedido proporciona métodos de purificação de polipeptídeos tendo uma região Fc, por exemplo, anticorpos ou fusões de anticorpo, através de adsorção dos polipeptídeos a um agente de ligação Fe tal como, por exemplo, Proteína A ou Proteína G, seguido por uma lavagem com um tampão de sal catiônico divalente para remover impurezas e subseqUente recuperação dos polipeptídeos adsorvidos. O presente pedido também se caracteriza por métodos de eluição do polipeptídeo purificado, bem como à incorporação dos métodos dentro de uma série de purificação. Kits compreendendo componentes para realizados dos métodos e instruções parauso também são proporcionados.



“MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA, PROTEÍNA, E, KIT”

PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica prioridade ao pedido de patente provisório "METHODS OF PURIFYING Fc REGION CONTAINING PROTEINS", depositado em 17 de Junho de 2005 tendo numero de série 60/691821. O conteúdo todo do presente pedido é incorporado aqui.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Anticorpos são componentes poderosos do sistema imune de muitos animais e especialmente seres humanos. Avanços recentes na tecnologia recombinante têm permitido a produção de anticorpos contra virtualmente qualquer alvo, por exemplo, células cancerígenas, bactérias e vírus. Tipicamente, um anticorpo é produzido usando uma linhagem de célula que foi manipulada para expressar o anticorpo em altos níveis. A linhagem de célula manipulada é subsequenteiramente crescida em uma cultura que compreende uma mistura complexa de açúcares, aminoácidos e fatores de crescimento, bem como várias proteínas incluindo, por exemplo, proteínas do soro. Contudo, separação de anticorpos completos de subprodutos de célula e componentes de cultura em uma pureza suficiente para uso em pesquisa ou como produtos terapêuticos impõe um desafio formidável. A purificação das moléculas de anticorpo é especialmente crítica se os anticorpos têm de ser usados como um fármaco para administração a seres humanos.

Esquemas tradicionais de purificação (ou séries) freqüentemente compreendem uma etapa de cromatografia a qual explora a capacidade da molécula de anticorpo de se ligar de preferência e ser retida pela fase sólida (ou fase sólida funcionalizada) de uma coluna de cromatografia comparado com a ligação ou retenção de várias impurezas. Esquemas foram propostos ou realizados para purificar anticorpos os quais ligam, primeiro, proteínas contendo região CH2/CH3 à Proteína A

imobilizada sobre uma fase sólida, seguido pela remoção de impurezas ligadas à fase sólida através de lavagem da fase sólida com um solvente de eletrólito hidrofóbico e a subsequente recuperação das proteínas contendo região CH2/CH3 da fase sólida. Contudo, esses esquemas são limitados pelo

5 fato de que as condições usadas para ligar de preferência ligar proteínas contendo região CH2/CH também suportam a ligação de impurezas (por exemplo, anticorpos com regiões CH2/CH3 incompletas). No desenvolvimento de produtos terapêuticos para seres humanos, tais impurezas são altamente indesejáveis.

10 Conseqüentemente, há uma necessidade por aperfeiçoamentos na purificação de proteínas ou polipeptídeos tendo regiões constantes, em particular proteínas tendo regiões Fc (por exemplo, anticorpos), produzidos em cultura de célula.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 Em vários aspectos, a presente invenção se caracteriza por métodos para separação de uma proteína tendo uma região Fc a de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas. Nos métodos da invenção, a proteína tendo uma região Fc (a proteína alvo) é adsorvida a um agente de ligação Fc e, então, o agente de ligação Fc é lavado com uma

20 solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas. A proteína é, então, recuperada do agente de ligação Fc em uma solução de eluição. Os métodos da invenção são particularmente úteis para remoção de impurezas, tais como espécies variantes de transleitura de íntron (IRT), sob espécies ligadas por dissulfeto (UDB) e/ou espécies

25 variantes de baixo peso molecular (LMW). Os métodos da invenção também são eficazes na remoção de impurezas, tais como proteínas de células hospedeiras (HCP) e DNA.

Os métodos da presente invenção compreendem uma ou mais etapas de separação cromatográfica e, além disso, pode compreender uma ou

mais etapas de filtração. As etapas de separação cromatográfica podem ser contínuas ou descontínuas (por exemplo, uma abordagem em batelada) ou uma combinação de ambos. Em várias modalidades, os métodos compreendem uma ou mais etapas de filtração, por exemplo, para remover vírus, concentrar e tamponar a solução contendo a proteína alvo e remover contaminantes microbianos.

Em várias modalidades, a proteína contendo região Fc é um polipeptídeo de ligação a antígeno (por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo) ou uma imunoadesina (por exemplo, uma imunoadesina de receptor de TNF). Em várias modalidades, a proteína contendo região Fc é uma fusão de anticorpo, um anticorpo de murino, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Em uma modalidade preferida, a proteína contendo região Fc é um anticorpo anti-IL-13 humano ou humanizado. Alternativamente, em outras modalidades, a proteína contendo região Fc pode se ligar a um antígeno, tal como A β , CD3, CD52, VEGF, EGFR, CD33, CD20, HER-2, TNF α , CD25, RSV, IgE, gp IIb/IIIa, CD11a ou integrina α 4.

Em várias modalidades, a proteína contendo região Fc é recombinantemente produzida. Em várias modalidades, a proteína contendo Fc é recombinantemente produzida em uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO).

Em várias modalidades, a uma ou mais impurezas compreendem um ou mais de uma proteína de célula hospedeira, um DNA de célula hospedeira, uma proteína de cultura de célula, uma espécie indesejada da proteína tendo uma região Fc e misturas dos mesmos. por exemplo, em várias modalidades, a espécie indesejada da proteína tendo uma região Fc compreende uma ou mais cadeias de anticorpo ou fragmentos das mesmas tendo uma ligação de dissulfeto inadequada, um meio-anticorpo ou fragmento do mesmo, um dímero de cadeia leve ou fragmento do mesmo e um dímero de cadeia pesada ou fragmento do mesmo.

Em um aspecto, os métodos da presente invenção purificam uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas primeiro através de adsorção da proteína a um agente de ligação Fc, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas e, subsequente, recuperação da proteína do agente de ligação Fc. Em várias modalidades, as etapas de adsorção da proteína a um agente de ligação Fc e lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente, são realizadas em uma temperatura na faixa entre cerca de 2°C a cerca de 24°C. Em várias modalidades, a etapa de recuperação da proteína do agente de ligação Fc compreende eluição da proteína usando um tampão de eluição tendo um pH na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 6,5.

Em várias modalidades, o agente de ligação à região Fc compreende uma ou mais de Proteína A e Proteína G. Em uma modalidade preferida, o agente de ligação Fc é imobilizada sobre uma fase sólida. Essa fase sólida pode compreender, por exemplo, um ou mais de um glóbulo, uma matriz de agarose, sílica e misturas dos mesmos.

O sal catiônico divalente presente no tampão que é usado para lavar o agente de ligação Fc pode compreender, por exemplo, um sal caotrópico. Sais catiônicos divalentes adequados para o preparo da solução tampão de lavagem incluem, mas não estão limitados a, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de níquel e misturas dos mesmos. Em várias modalidades, sais catiônicos divalentes adequados para preparo da solução tampão de lavagem incluem, mas não estão limitados a, sais de tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), cloreto e brometo de cátions do grupo II (por exemplo, magnésio, cálcio, bário, etc.), sais de metal de transição divalente (por exemplo, cobre, níquel, manganês, etc.) e combinações desses sais.

Em várias modalidades, a solução tampão contendo o sal catiônico divalente tem um valor de pH na faixa entre cerca de 4 a cerca de 9 e, em algumas modalidades, entre cerca de 4 a cerca de 8, entre cerca de 4,5 a cerca de 7,5 ou entre cerca de 6 a cerca de 8. Valores e faixas incluídas e/ou intermediárias dentro das faixas apresentadas aqui também se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, o sal catiônico divalente tem um valor de pH entre cerca de 7,1 a cerca de 7,9, entre cerca de 7,2 a cerca de 7,9, entre cerca de 7,3 e cerca de 7,7, entre cerca de 7,4 a cerca de 7,6, entre cerca de 4 a cerca de 5, entre cerca de 5 a cerca de 6, entre cerca de 6 a cerca de 7 ou entre cerca de 8 a cerca de 9.

Além disso, faixas tendo valores mencionados aqui como um limite máximo ou mínimo se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, o sal catiônico divalente tem um pH de pelo menos cerca de (ou cerca de) 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 ou 8.

Em várias modalidades, a solução tampão tem uma concentração de sal catiônico divalente na faixa entre cerca de 0,1 M a cerca de 5 M e, em algumas modalidades, entre cerca de 0,5 M a cerca de 3 M, entre cerca de 1,0 M a cerca de 3 M ou entre cerca de 0,6 M a cerca de 2,5 M. Por exemplo, o tampão de cátion divalente pode compreender CaCl_2 a pelo menos cerca de 15 a cerca de 0,6 M ou MgCl_2 a pelo menos cerca de 2M ou CaCl_2 a pelo menos cerca de 2M. Valores e faixas incluídas e/ou intermediárias dentro das faixas apresentadas aqui também se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, a solução tampão tem uma concentração de sal catiônico divalente entre cerca de 0,5 M a cerca de 0,75 M, entre cerca de 0,5 M a cerca de 0,8 M, entre cerca de 0,5 M a cerca de 0,9 M, entre cerca de 0,5 M a 1,0 M, entre cerca de 0,5 M a 2 M, entre cerca de 1,5 M a cerca de 2,0 M, entre cerca de 1,5 M a cerca de 2,5 M, entre cerca de 1,5 M a cerca de 3,0 M ou entre cerca de 2,5 M a cerca de 3 M.

Além disso, faixas tendo valores mencionados aqui como um

limite máximo ou mínimo se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, a solução tampão tem uma concentração de sal catiônico divalente de pelo menos cerca de (ou cerca de) 0,6 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M ou 3 M.

5 Em várias modalidades, a solução tampão contendo um sal catiônico divalente tem uma temperatura na faixa entre cerca de 2°C a cerca de 24°C. Em várias modalidades, a etapa de recuperação da proteína do agente de ligação Fc compreende eluição da proteína usando um tampão de eluição tendo um pH na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 6,5, de preferência na
10 faixa de cerca de 2,0 a cerca de 4,0, mais preferivelmente na faixa de cerca de 2,5 a cerca de 3,5. Valores e faixas incluídas e/ou intermediárias dentro das faixas apresentadas aqui também se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, o tampão de eluição tem um pH de entre cerca de 2 a cerca de 3 ou entre cerca de 3 a cerca de 4.

15 Além disso, faixas dentro os valores mencionados aqui como um limite máximo ou mínimo se destinam a estar dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, o tampão de eluição tem um pH de pelo menos cerca de (ou cerca de) 2, 2,5, 3, 3,5 ou 4.

 Em várias modalidades, as proteínas recuperadas podem ser
20 submetidas à etapas adicionais de purificação antes de ou após a etapa de cromatografia do agente de ligação Fc. Por exemplo, etapas de purificação adicionais exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a: cromatografia de troca de ânions, cromatografia de troca de cátions, cromatografia por afinidade de metal imobilizado, cromatografia por interação hidrofóbica
25 (HIC), cromatografia em hidroxiapatita, diálise, cromatografia por afinidade, precipitação de sulfato de amônio, precipitação de etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatofocalização, ultrafiltração, diafiltração, microfiltração e filtração em gel. Em várias modalidades, a etapa de cromatografia de agente de ligação Fc é seguida por uma cromatografia de

troca de ânions e uma etapa de HIC. Em várias modalidades, as etapas de cromatografia são ainda seguidas por uma etapa de filtração de vírus, uma etapa de ultrafiltração/diafiltração e/ou uma etapa de filtração de contaminante microbiano.

5 Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos para purificação de um anticorpo de uma solução contendo impureza do mesmo. Em várias modalidades, os métodos compreendem primeiro adsorção da proteína a um agente de ligação Fc, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para
10 remover uma ou mais impurezas e, subsequente, recuperação da proteína do agente de ligação Fc para produzir um primeiro reservatório de eluente.

 Em várias modalidades, o processo de purificação continua com sujeição do primeiro reservatório de eluente à cromatografia de troca de
15 íons através de contato de uma resina de troca de íons com o primeiro reservatório de eluente, de modo que a proteína alvo não adsorve à resina e recuperação da proteína alvo no escoamento para produzir um segundo reservatório de eluente. Em várias modalidades, a etapa de cromatografia de troca de íons ainda compreende lavagem da resina de troca de íons com uma
20 solução de lavagem tamponada para recuperar pelo menos uma porção de qualquer proteína alvo adsorvida.

 Em várias modalidades, o processo de purificação continua com sujeição do segundo reservatório de eluente à cromatografia de interação hidrofóbica através de adsorção da proteína alvo a uma resina de interação
25 hidrofóbica (por exemplo, uma fase sólida funcionalizada com ligantes hidrofóbicos), lavagem da resina de interação hidrofóbica com uma solução de lavagem tamponada com uma resistência iônica a qual não elui substancialmente a proteína alvo e recuperação da proteína alvo purificada (tipicamente usando um tampão de eluição com uma resistência iônica baixa

o bastante para desabsorver a proteína alvo da resina de interação hidrofóbica).

Em modalidades preferidas dos vários aspectos da invenção, o agente de ligação Fc é imobilizado sobre uma fase sólida a qual é, de preferência, equilibrada com um tampão adequado antes de contato com o líquido fonte. A fase sólida é, de preferência, uma coluna compreendendo agarose que imobiliza o agente de ligação Fc. Em várias modalidades, a coluna é revestidas com um reagente, tal como glicerol, para diminuir ou prevenir aderência não específica à coluna.

Em várias modalidades, as proteínas purificadas através dos métodos da presente invenção podem ser formuladas em um veículo farmacologicamente aceitável e usadas para vários usos diagnósticos, terapêuticos ou outros conhecidos para tais moléculas.

Em vários aspectos, a presente invenção proporciona métodos para purificação de uma proteína contendo região Fc de uma solução contendo a proteína e variantes de transleitura de íntron (IRT). Em aspectos característicos, métodos da presente invenção são usados para reduzir os níveis de uma ou mais espécies variantes de transleitura de íntron em um preparado de proteína, por exemplo, em um preparado de anticorpo. Em várias modalidades, a proteína recuperada do agente de ligação Fc tem um nível de variantes de transleitura de íntron que é pelo menos 5 vezes menos do que o nível de variantes de transleitura de íntron no líquido fonte e, em algumas modalidades, pelo menos 10 vezes menos do que o nível de variantes de transleitura de íntron no líquido fonte. Em várias modalidades, as variantes de transleitura de íntron compreendem pelo menos cerca de 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2% ou 0,1% das espécies da referida proteína na solução contendo a referida proteína recuperada do agente de ligação Fc.

Em vários aspectos, a presente invenção proporciona métodos para purificação de uma proteína contendo região Fc de uma solução

contendo a proteína e variantes de baixo peso molecular da mesma (LMW). Em aspectos característicos, métodos da invenção são usados para reduzir os níveis de uma ou mais espécies variantes de baixo peso molecular em um preparado de proteína, por exemplo, em um preparado de anticorpo. Em 5 várias modalidades, a proteína recuperada do agente de ligação Fc tem um nível de variantes de baixo peso molecular que é pelo menos 5 vezes menos do que o nível de variantes de baixo peso molecular no líquido fonte e, em algumas modalidades, pelo menos 10 vezes menos do que o nível de variantes de baixo peso molecular no líquido fonte. Em várias modalidades, as 10 variantes de baixo peso molecular compreendem menos de cerca de 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2% ou 0,1% das espécies da referida proteína na solução contendo a referida proteína recuperada do agente de ligação Fc.

Em vários aspectos, a presente invenção proporciona métodos para purificação de uma proteína contendo uma região Fc de uma solução 15 contendo a proteína e sob variantes ligadas por dissulfeto (UDB) da mesma. Em aspectos característicos, métodos da presente invenção são usados para reduzir os níveis de uma ou mais espécies variantes ligadas por dissulfeto em um preparado de proteína, por exemplo, em um preparado de anticorpo. Em várias modalidades, a proteína recuperada do agente de ligação Fc tem um 20 nível de variantes ligadas por dissulfeto que é pelo menos 5 vezes menos do que o nível de variantes ligadas por dissulfeto no líquido fonte e, em algumas modalidades, pelo menos 10 vezes menos do que o nível de variantes ligadas por dissulfeto no líquido fonte. Em várias modalidades, as variantes ligadas por dissulfeto compreendem menos do que cerca de 20%, 15%, 10%, 5%, 2% 25 ou 1% das espécies da referida proteína na solução contendo a referida proteína recuperada do agente de ligação de Fc.

Em outro aspecto, a invenção pertence a uma proteína contendo região Fc purificada de acordo com o método da invenção.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um sistema

adequado para realizar qualquer um dos métodos que compreendem pelo menos as etapas de, primeiro, adsorção da proteína a um agente de ligação Fc, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas e, subsequente, recuperação da proteína do agente de ligação Fc.

Em outros aspectos, a presente invenção proporciona uma série de purificação para realizar qualquer um dos métodos que compreende pelo menos as etapas de, primeiro, adsorção da proteína a um agente de ligação Fc, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas e, subsequente, recuperação da proteína do agente de ligação Fc.

A presente invenção também se caracteriza, em vários aspectos, por kits para uso na realização de um ou mais dos métodos da presente invenção. Em várias modalidades, o kit compreende um ou mais reagentes, tais como um agente de ligação Fc, um sal catiônico divalente e reagentes para o preparo de uma solução tampão de lavagem contendo um sal catiônico divalente, junto com instruções para uso do kit.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Antes de descrever a invenção, pode ser útil, para uma compreensão da mesma, apresentar definições de determinados termos a serem usados aqui. As definições apresentadas aqui foram agrupadas para facilidade de referência apenas e não como forma de limitação.

Definições Relacionadas à Proteínas

Em vários aspectos, a presente invenção proporciona métodos para purificação de uma proteína contendo região Fc de uma solução contendo a proteína e uma ou mais variantes de transleitura da mesma tais como, por exemplo, variantes de transleitura de íntron. Em aspectos característicos, os métodos da presente invenção são usados para reduzir os

níveis de uma ou mais espécies variantes de transleitura de íntron (IRT) em um preparado de proteína, por exemplo, em um preparado de anticorpo. Os termos "variante de transleitura de íntron" e "espécies variantes de transleitura de íntron" são usados permutavelmente aqui e se referem ao produto de um processo onde, na síntese da proteína contendo região Fc de interesse (por exemplo, a proteína alvo), alongamento da cadeia polipeptídica é terminado antes de transcrição de uma região de codificação por um códon terminal no íntron antes da região de codificação. O resultado é uma variante da proteína de interesse (isto é, uma variante de transleitura de íntron) com um ou mais domínios faltando ou incompletos. Tais íntrons podem conter mais de um códon terminal, resultando na possibilidade de produção de diversas variantes de transleitura de íntron diferentes.

O termo "variante ligada por dissulfeto" ou "UDB" se refere a qualquer espécie onde pelo menos uma ligação de dissulfeto está faltando. A ligação de dissulfeto faltando pode ser uma ligação de dissulfeto intercadeia ou uma ligação de dissulfeto intracadeia ou uma combinação dos dois.

O termo "espécie de baixo peso molecular" ou espécie "LMW" se refere à variantes da proteína contendo região Fc, incluindo uma espécie de proteína que consiste de espécies IRT de cadeia pesada livre, cadeia leve livre, meia-molécula e três-quartos-molécula ou misturas dos mesmos.

Proteína A é uma proteína da parede celular de cerca de 42 kD encontrada na maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* a qual se liga com alta afinidade (cerca de 10^{-8} M à IgG humana) à região Fc de anticorpos. Conforme usado aqui, o termo "Proteína A" abrange Proteína A recuperada de uma fonte nativa da mesma, Proteína A produzida sinteticamente (por exemplo, através de síntese de peptídeo, através de técnicas recombinantes, etc.) e variantes da mesma as quais retêm a capacidade de se ligar à proteínas as quais têm uma região CH2/CH3.

Proteína G é uma proteína da parede celular de estreptococos

do grupo G. Proteína G é um receptor de Fc do tipo III o qual se liga com alta afinidade à região Fc de anticorpos, em particular, anticorpos de IgG. Conforme usado aqui, o termo "Proteína G" abrange Proteína G recuperada de uma fonte nativa da mesma, Proteína G produzida sinteticamente (por exemplo, através de síntese de peptídeo, através de técnicas recombinantes, etc.) e variantes da mesma, as quais retêm a capacidade de se ligar à proteínas as quais têm uma região Fc.

O termo "anticorpo" ou "imunoglobulina" (usados permutavelmente aqui) se refere a uma proteína de ligação a antígeno tendo uma estrutura de cadeia básica com quatro polipeptídeos consistindo de duas cadeias pesadas e duas leves, as referidas cadeias sendo estabilizadas, por exemplo, através de ligações de dissulfeto intercadeia, a qual tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Cadeias pesadas e leves são duplicadas em domínios.

O termo "domínio" se refere a uma região globular de um polipeptídeo de cadeia pesada ou leve compreendendo voltas de peptídeo (por exemplo, compreendendo 3 a 4 voltas de peptídeo) estabilizados, por exemplo, por uma folha β -dobrada e/ou ligação de dissulfeto intracadeia. Domínios são ainda referidos aqui como "constantes" ou "variáveis", baseado na falta relativa de variação de seqüência dentro dos domínios de vários membros da classe no caso de um domínio "constante" ou a variação significativa dentro dos domínios de vários membros da classe no caso de um domínio "variável". Domínios "constantes" sobre a cadeia leve são referidos permutavelmente como "regiões constantes de cadeia leve", "domínios constantes de cadeia leve", regiões "CL" ou domínios "CL"). Domínios "constantes" sobre a cadeia pesada são referidos permutavelmente como "regiões constantes de cadeia pesada", "domínios constantes de cadeia pesada", regiões "CH" ou domínios "CH"). Domínios "variáveis" sobre a cadeia leve são referidos permutavelmente como "regiões variáveis de cadeia

leve", "domínios variáveis de cadeia leve", regiões "VL" ou domínios "VL"). Domínios "variáveis" da cadeia pesada são referidos permutavelmente como "regiões variáveis de cadeia pesada", "domínios variáveis de cadeia pesada", regiões "VH" ou domínios "VH").

5 O termo "fragmento" se refere a uma parte ou porção de um anticorpo ou cadeia de anticorpo compreendendo menos resíduos de aminoácido do que um anticorpo ou cadeia de anticorpo intacta ou completa. Fragmentos podem ser obtidos via tratamento químico ou enzimático de um anticorpo ou cadeia de anticorpo intacta ou completa. Fragmentos também
10 podem ser obtidos através de meios recombinantes. Fragmentos exemplificativos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc e/ou Fv. O termo "fragmento de ligação a antígeno" se refere a um fragmento de polipeptídeo de uma imunoglobulina ou anticorpo que se liga a um antígeno ou compete com o anticorpo intacto do qual ele é derivado pela ligação
15 antígeno-específica.

Os termos "proteína de fusão de anticorpo" e "fusão de anticorpo" se referem a uma proteína de fusão incluindo toda ou uma parte de um anticorpo fundido a pelo menos uma porção ou polipeptídeo de proteína de não-anticorpo. Fusão é, em geral, realizada através de manipulação
20 genética do gene que codifica a referida proteína. Proteínas de fusão de anticorpo exemplificativas adicionais incluem a porção de ligação a receptor celular de um anticorpo (incluindo a região Fc) fundida a toda ou uma parte de outra proteína biológica solúvel ou celular, por exemplo, um receptor (celular ou solúvel) ou porção do mesmo, uma citocina ou porção da mesma,
25 uma enzima ou porção da mesma, etc. Tais proteínas de fusão de anticorpo que compreendem a região Fc do anticorpo fundida à outra proteína também são referidas na técnica como proteínas de fusão de Fc.

O termo "agente de ligação Fc" se refere a uma molécula que é capaz de ligação à região Fc de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo de

IgG) incluindo, mas não limitado a, uma proteína complementar, um receptor de Fc ou uma proteína derivada de bactéria, tal como Proteína A ou Proteína G, que tem alta afinidade pela região Fc de um anticorpo.

O termo "região Fc" se refere a uma região C-terminal de um anticorpo de IgG, em particular à região C-terminal da(s) cadeia(s) pesada(s) do referido anticorpo de IgG. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de IgG possam variar ligeiramente, uma região Fc é, tipicamente, definida como abrangendo de cerca do resíduo de aminoácido Cys226 ao carboxi-término de (uma) cadeia(s) pesada(s) de IgG.

10 **Definições Relacionadas à Cromatografia**

O termo "líquido fonte", conforme usado aqui, se refere a um líquido contendo pelo menos uma substância alvo a qual se deseja purificar de outras substâncias também presentes. Líquidos fonte podem, por exemplo, ser soluções aquosas, sistemas de solvente orgânicos ou misturas ou soluções de solvente aquoso/orgânico. Os líquidos fonte são, freqüentemente, misturas ou soluções complexas contendo muitas moléculas biológicas (tais como proteínas, anticorpos, hormônios e vírus), pequenas moléculas (tais como sais, açúcares, lipídios, etc.) e mesmo matéria em partículas. Embora um líquido fonte típico de origem biológica possa começar como uma solução ou suspensão aquosa, ele também pode conter solventes orgânicos usados em etapas anteriores de separação, tais como precipitações de solvente, extrações e semelhantes. Exemplos de líquidos fonte que podem conter substâncias biológicas valiosas passíveis da purificação através de várias modalidades da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, um sobrenadante de cultura de um bioreator, uma suspensão de célula homogeneizada, plasma, frações de plasma e leite.

O termo "substância alvo" ou "proteína alvo" se refere aqui a uma ou mais proteínas contendo região Fc desejadas a serem purificadas do líquido fonte. A substância alvo pode estar presente no líquido fonte como

uma suspensão ou em solução.

O termo "impurezas" se refere a materiais no líquido fonte que são diferentes da(s) substância(s) alvo e são, desejavelmente, excluídas do(s) produto(s) da substância alvo final. Impurezas típicas incluem ácidos nucleicos, proteínas (incluindo espécies de transleitura de íntron, espécies de baixo peso molecular e espécies ligadas por dissulfeto), peptídeos, endotoxinas, vírus e pequenas moléculas.

Conforme usado aqui, o termo "fase sólida" se refere a uma matriz não aquosa com a qual uma substância alvo interage durante purificação ou à qual um agente de ligação Fc pode aderir. Materiais de fase sólida adequados incluem, mas não estão limitados a, vidro, sílica (por exemplo, gel de sílica), polissacarídeos (por exemplo, uma matriz de polissacarídeo), tal como agarose e celulose, polímeros orgânicos, tais como poli(acrilamida), metilmetacrilato e copolímeros de poliestireno-divinilbenzeno tais como, por exemplo, resina Amberlite™ (comercialmente disponível da Rohm & Haas Chemical Co., Filadélfia, Pa.). A fase sólida pode ser selecionada de qualquer um dos grupos de resinas comumente descritos como resinas de afinidade, troca de íons e captura de íons. A fase sólida pode ser, por exemplo, uma coluna de purificação, uma fase descontínua de partículas distintas ou uma combinação dos mesmos. A fase sólida pode ser de caráter poroso ou não poroso e pode ser compressível ou não compressível. Em várias modalidades, a fase sólida é uma matriz polimérica ou uma partícula ou glóbulo de agarose. Em várias modalidades, a fase sólida pode ser revestida com um reagente (tal como glicerol), por exemplo, para prevenir aderência não específica de impurezas à fase sólida. Uma fase sólida de ligação de Fc precisa possuir apenas uma química ou um ligante associado que permitirá que o agente de ligação Fc venha a aderir à superfície da fase sólida. Materiais de fase sólida preferidos serão física e quimicamente resilientes às condições empregadas no processo de purificação, incluindo bombeamento e

filtração de fluxo transversal, e temperaturas, pH e outros aspectos dos líquidos empregados.

"Ligante de afinidade" se refere a uma porção que se liga seletivamente ou de preferência a um componente do líquido fonte através de uma interação específica com um sítio de ligação do componente. Na presente invenção, o ligante de afinidade (por exemplo, um agente de ligação Fc) é, tipicamente, imobilizado a uma fase sólida, tal como uma resina. Exemplos de ligantes de afinidade que podem ser ligados ao suporte de resina para proporcionar resinas de cromatografia úteis no processo da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, Proteína A, Proteína G e seus análogos, os quais se ligam seletivamente a uma região Fc de proteína. Métodos de ligação de ligantes de afinidade a materiais de suporte sólidos são bem conhecidos na técnica de purificação. Veja, por exemplo, os textos de referência *Affinity Separations: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Paul Matejtschuk (Editor), H Pr: 1997; e *Affinity Chromatography*, Herbert Schott, Marcel Dekker, New York: 1997.

"Resina de cromatografia por afinidade" ou "resina de afinidade" se referem a uma resina de cromatografia que compreende uma fase sólida ou substrato com ligantes de afinidade ligados às suas superfícies.

"Resina de cromatografia de troca de íons" ou "resina de troca de íons" se refere a um suporte sólido ao qual são covalentemente ligados ligantes que trazem uma carga positiva ou negativa e o qual, assim, tem contra-íons livres disponíveis para troca com íons em uma solução com a qual a resina de troca de íons é contatada.

"Resina de troca de cátions" se refere a uma resina de troca de íons com ligantes negativamente carregados covalentemente ligados e a qual, assim, tem cátions livres para troca com cátions em uma solução com a qual a resina é contatada. Uma ampla variedade de resinas de troca de cátions é conhecida na técnica, por exemplo, aquelas em que os grupos covalentemente

ligados são carboxilato ou sulfonato. Resinas de troca de cátions comercialmente disponíveis incluem CMC-celulose, SP-Sephadex™ e Fast S-Sepharose™ (as duas últimas estando comercialmente disponíveis da Pharmacia).

5 "Resinas de troca de ânions" se refere a uma resina de troca de íons com grupos positivamente carregados covalentemente ligados, tais como grupos amino quaternários. Resinas de troca de ânions comercialmente disponíveis incluem DEAE celulose, TMAE, QAE Sephadex™ e Fast Q Sepharose™ (as duas últimas estando comercialmente disponíveis da
10 Pharmacia).

Conforme usado aqui, o termo "sal caotrópico" se refere a um sal o qual compreende um ou mais componentes iônicos que estão em baixo teor na série liotrópica que são capazes de penetrar nos envoltórios de hidratação de proteína e se ligar diretamente à suas superfícies. Isso rompe a
15 associação co-hidratante, favorecendo a solubilização de proteína. Exemplos de sais caotrópicos incluem, mas não estão limitados a, sais de haleto de elementos do Grupo II (por exemplo, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de bário, brometo de cálcio, brometo de magnésio, brometo de bário, iodeto de cálcio, iodeto de magnésio, iodeto de bário).

20 Exemplos de sais catiônicos divalentes adequados incluem, mas não estão limitados a, sais de Mn^{2+} , Ni^{2+} ou Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ba^{2+} com tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), cloreto (Cl^-) e brometo (Br^-); e combinações dos mesmos.

Em determinadas modalidades, o sal catiônico divalente
25 compreende um cátion divalente (por exemplo, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} ou Ba^{2+}). Sais caotrópicos preferidos para uso nos processos caracterizados são $MgCl_2$, $NiCl_2$ e $CaCl_2$. Após a etapa de lavagem com sal catiônico divalente, a proteína alvo é eluída da matriz de cromatografia por afinidade.

Um "tampão" é uma substância a qual, em virtude de sua

presença em solução, aumenta a quantidade de ácido ou álcali que deve ser adicionado para causar uma alteração unitária no pH. Uma solução tamponada resiste a alterações no pH através da ação de seus componentes de conjugado ácido-base. Soluções tamponadas para uso com reagentes biológicos são geralmente capazes de manutenção de uma concentração constante de íons de hidrogênio, de modo que o pH da solução esteja dentro de uma faixa fisiológica. O termo "pH fisiológico" se refere ao pH do sangue de mamífero (isto é, 7,38 ou cerca de 7,4). Assim, uma faixa de pH fisiológico é de cerca de 7,2 a 7,6. Componentes tampões adicionais para uso na purificação de moléculas biológicas (por exemplo, moléculas de proteína) incluem os tampões zwitteriônicos ou de "Good", veja, por exemplo, Good e colaboradores (1966) *Biochemistry* 5: 467 e Good e Izawa (1972) *Methods Enzymol.* 24: 62. Tampões exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, TES, MES, PIPES, HEPES, MOPS, MOPSO, TRICINE e BICINE.

O "tampão de equilíbrio" aqui é um tampão usado para preparar o reagente de ligação Fc, fase sólida ou ambos, para carregamento do líquido fonte contendo a proteína alvo. O tampão de equilíbrio é, de preferência, isotônico e comumente tem um pH na faixa de cerca de 6 a cerca de 8. O "tampão de carregamento" é um tampão usado para carregar o líquido fonte contendo a proteína contendo região Fc e impurezas sobre a fase sólida à qual o agente de ligação Fc está imobilizado. Frequentemente, os tampões de equilíbrio e carregamento são os mesmos. O "tampão de eluição" é usado para eluir a proteína contendo região Fc do agente de ligação Fc imobilizado. De preferência, o tampão de eluição tem um baixo pH e, desse modo, rompe as interações entre o agente de ligação Fc e a proteína de interesse. De preferência, o tampão de eluição de baixo pH tem um pH na faixa de cerca de 2 a cerca de 5, mais preferivelmente na faixa de cerca de 3 a cerca de 4. Exemplos de tampões que controlarão o pH dentro dessa faixa incluem tampões de glicina, fosfato, acetato, citrato e amônio, bem como combinações

desses. Os preferidos de tais tampões são tampões de citrato e acetato, mais preferivelmente tampões de citrato de sódio ou acetato de sódio. Outros tampões de eluição são considerados, incluindo tampões de elevado pH (por exemplo, aqueles tendo um pH de 9 ou mais) ou tampões compreendendo um composto ou composição, tal como MgCl_2 (2 mM) para eluição da proteína de interesse.

"Líquido de lavagem" ou "tampão de lavagem", conforme usado aqui, se refere todos aqui ao líquido usado para retirar quaisquer impurezas da resina de cromatografia à qual está ligada a substância alvo. Mais de um líquido de lavagem pode ser empregado sequencialmente, por exemplo, com os líquidos de lavagem sucessivos tendo propriedades variadas, tais como pH, condutividade, concentração de solvente, etc., projetadas para dissociar e remover tipos variados de impurezas que são não-especificamente associadas à resina de cromatografia.

"Líquido de eluição" ou "tampão de eluição" se refere aqui ao líquido que é usado para dissociar a substância alvo da resina de cromatografia após ela ter sido lavada com um ou mais líquidos de lavagem. O líquido de eluição atua para dissociar a substância alvo sem desnaturação da mesma irreversivelmente. Líquidos de eluição típicos são bem conhecidos na técnica de cromatografia e podem ter maiores concentrações de sais, ligantes de afinidade livres ou análogos ou outras substâncias que promovem a dissociação da substância alvo da resina de cromatografia. "Condições de eluição" se refere à condições de processo impostas sobre a resina de cromatografia ligada à substância alvo que dissociam a substância alvo da resina de cromatografia, tal como o contato da resina de cromatografia ligada à substância alvo com um líquido de eluição ou tampão de eluição para produzir tal dissociação.

"Líquido de limpeza" ou "tampão de limpeza" se refere aqui ao líquido que é usado para lavar a resina de cromatografia após o término do

processo de purificação. O líquido de limpeza pode conter um detergente, um agente para inativação de vírus ou concentrações relativamente altas de sais e pode ter um pH maior ou menor do que os líquidos usados durante o processo de purificação. Sua finalidade é descontaminar a resina de cromatografia de forma a torná-la pronta para reutilização. Líquidos de limpeza típicos são bem conhecidos na técnica de cromatografia.

"Líquido de armazenamento" ou "tampão de armazenamento" se refere aqui ao líquido no qual a resina de cromatografia é suspensa entre os usos. Líquidos de armazenamento, além de íons de tamponamento, podem também conter microbicidas ou outros conservantes. Tais líquidos de armazenamento são bem conhecidos na técnica de cromatografia.

Em vários aspectos, a presente invenção se caracteriza por métodos para purificação de uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas através de adsorção da proteína a um agente de ligação Fc, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impureza e, subsequente, recuperação da proteína do agente de ligação Fc. Agentes de ligação Fc adequados incluem, mas não estão limitados a, Proteína A e Proteína G.

A presente invenção se caracteriza por processos para a purificação de proteínas contendo região Fc, por exemplo, anticorpos. Processos de purificação exemplificativos incluem uma etapa de cromatografia por afinidade. A etapa de cromatografia por afinidade pode ser contínua, descontínua ou uma combinação de ambos. Por exemplo, a etapa de cromatografia por afinidade pode ser realizada como um processo descontínuo tal como, por exemplo, um processo em batelada. Cromatografia por afinidade é um processo de adsorção bio-seletiva e subsequente recuperação de um composto alvo de um ligante imobilizado. Esse processo permite a purificação altamente específica e eficaz do composto alvo. O

processo requer a utilização de um ligante apropriadamente seletivo (por exemplo, agente de ligação Fc) o qual se ligará ao composto alvo (por exemplo, uma proteína contendo região Fc) geralmente com uma constante de dissociação na faixa de 10^{-4} a 10^{-8} , ao mesmo tempo em que permite a
5 recuperação sob condições suaves. O ligante é, geralmente, imobilizado sobre uma matriz em glóbulo e porosa a qual pode estar na forma de um meio de acondicionamento de coluna ou adsorção em batelada.

Um agente de ligação preferido é Proteína A. Proteína A se liga à região Fc de imunoglobulinas. A Proteína A consiste de seis regiões,
10 cinco das quais se ligam à IgG. Ela se liga com alta afinidade à IgG₁, IgG₂ e IgG₄ humana, bem como IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de camundongo. Proteína A se liga com afinidade moderada à IgD, IgM, IgA e IgE humana, bem como IgG₁ de camundongos. Como um ligante de afinidade, a Proteína A é imobilizada a uma matriz de modo que essas regiões estejam livres para ligação. Uma
15 molécula da Proteína A imobilizada pode se ligar a pelo menos duas moléculas de IgG. Versões nativas e recombinantes de Proteína A compartilham especificidade similar pela região Fc de IgG. Proteína A recombinante (rProteína A) pode ser manipulada para incluir, por exemplo, uma cisteína C-terminal, e pode ser imobilizada, via acoplamento de tioéster,
20 a uma matriz de fase sólida. Tal acoplamento resulta em capacidade de ligação intensificada da Proteína A.

Um agente de ligação alternativo é Proteína G. Proteína G é específica para IgG, se ligando com alta afinidade à IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ humana, bem como IgG₁ e IgG₃ de camundongo. Proteína G PLUS tem
25 afinidade moderada pela IgG₄ humana e IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de camundongo. Proteína G recombinante (rProteína G) pode ser manipulada para deletar a região de ligação à albumina da proteína nativa. Proteína G recombinante contém duas regiões de ligação Fc.

Um agente de ligação alternativo é Proteína A/G. Proteína A/G

é uma proteína geneticamente manipulada que combina os perfis de ligação à IgG da Proteína A e da Proteína G. Ela é um produto de fusão genética secretado de uma forma não patogênica de *Bacillus*. Proteína A/G contém quatro domínios de ligação Fc da Proteína A e dois da Proteína G. Proteína A/G não é dependente do pH como a Proteína A mas, de outro modo, tem as propriedades aditivas das Proteínas A e G.

Proteína A/G se liga a todas as subclasses de IgG humana, particularmente adequadas para purificação de anticorpos policlonais ou monoclonais de IgG cujas subclasses não foram determinadas. Além disso, ela se liga à IgA, IgE, IgM e (até menor ponto) IgD. Proteína A/G também se ligam a todas as subclasses de IgG de camundongo, particularmente adequada para a purificação de anticorpos monoclonais de camundongo de subclasses de IgG, sem interferência de IgA, IgM e albumina de soro de murino. (Veja, por exemplo, Sikkema. (1989) *Amer. Biotech. Lab* 7, 42). Subclasses individuais de monoclonais de camundongo podem ter uma afinidade mais forte pela Proteína A/G quimérica do que a Proteína A ou Proteína G (veja, por exemplo, Eliasson e colaboradores (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4323-4327).

Na presente invenção, o agente de ligação Fc imobilizado (por exemplo, Proteína A) é lavado com uma solução de sal catiônico divalente para remover impurezas. Em particular, descobriu-se que impurezas indesejadas produzidas como um resultado de tecnologias de expressão de anticorpo recombinante podem ser removidas usando uma etapa de lavagem com sal catiônico divalente.

Os métodos da presente invenção podem, opcionalmente, incluir etapas de purificação subseqüentes às etapas de cromatografia por afinidade e lavagem com cátion divalente. Etapas de purificação subseqüentes podem incluir uma etapa de cromatografia de troca de íons e/ou uma etapa de cromatografia por interação hidrofóbica (HIC). Etapas de cromatografia

subseqüentes podem ser contínuas, descontínuas (por exemplo, tal como um processo em batelada) ou uma combinação de ambos. Cromatografia de troca de íons separa moléculas baseadas em diferenças entre a carga global das proteínas. A proteína alvo deve ter uma carga oposta àquela do grupo funcional preso à resina de forma a se ligar. Por exemplo, anticorpos, os quais geralmente têm uma carga global positiva, se ligarão bem à permutadores de cátions, os quais contêm grupos funcionais negativamente carregados. Em virtude do fato de essa interação ser iônica, a ligação deve ocorrer sob baixas condições iônicas. Eluição é obtida através de aumento da resistência iônica para romper a interação iônica ou alterando-se o pH da proteína.

Enquanto que cromatografia de troca de íons conta com as cargas de proteínas para isolá-las, cromatografia por interação hidrofóbica usa propriedades hidrofóbicas de algumas proteínas. Grupos hidrofóbicos sobre a proteína se ligam a grupos hidrofílicos sobre a coluna. Quanto mais hidrofóbica é uma proteína, mais forte ela se ligará à coluna. A etapa de HIC remove, por exemplo, impurezas derivadas da célula hospedeira (por exemplo, DNA e outras espécies relacionadas a produto de alto e baixo peso molecular). Outras etapas de purificação podem incluir etapas de remoção de vírus, bem como etapas de ultrafiltração e diafiltração, conforme descrito aqui.

Em várias modalidades, a proteína contendo região Fc é um anticorpo ou uma proteína de fusão de anticorpo tendo uma região Fc que se liga a um receptor de Fc do agente de ligação Fc. O uso da solução tampão contendo um sal catiônico divalente para lavar o agente de ligação Fc permite maior remoção de impurezas tais como, por exemplo, variantes de transleitura e fragmentos contendo região constante (incluindo espécies LMW e UDB), da proteína de interesse (por exemplo, a substância alvo no líquido fonte).

Os métodos da presente invenção compreendem uma ou mais etapas de separação cromatográfica e, além disso, podem compreender uma

ou mais etapas de filtração para separação de uma proteína tendo uma região Fc ("a proteína alvo") de impurezas em um líquido fonte. Por exemplo, o líquido fonte pode ser filtrado, centrifugado ou de outro modo processado para remover restos em partículas e semelhantes antes de contato do líquido fonte com o agente de ligação Fc. Por exemplo, usando técnicas recombinantes, proteínas podem ser produzidas intracelularmente, no espaço periplásmico ou secretadas diretamente no meio de cultura. Se a proteína é produzida intracelularmente, os restos em partículas, quer células hospedeiras ou fragmentos submetidos à lise, podem ser removidos, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltração. Onde a proteína é secretada no meio, as células hospedeiras recombinantes podem ser separadas do meio de cultura de células, por exemplo, através de filtração com fluxo tangencial.

Em várias modalidades, o líquido fonte contendo a proteína alvo é contatado com um agente de ligação Fc (de preferência, imobilizado sobre uma fase sólida e equilibrado com um tampão adequado). O líquido fonte é contatado com o agente de ligação Fc (por exemplo, um agente de ligação Fc imobilizado) em um tampão de carregamento o qual pode ser o mesmo que o tampão de equilíbrio. À medida que o líquido fonte contendo impureza flui através da fase sólida, a proteína alvo é adsorvida ao agente de ligação Fc e várias outras impurezas (tais como proteínas de célula hospedeira, onde a proteína alvo é produzida em uma célula hospedeira recombinante, ou outras impurezas derivadas de processo) escoam ou se ligam não especificamente à fase sólida. Em várias modalidades, o agente de ligação Fc é Proteína A e o tampão de equilíbrio pode ser Tris a 20 mM, NaCl a 0,15 M, pH de 7,5. Outros tampões de equilíbrio adequados incluem, por exemplo, BIS, HEPES, etc., em concentrações fisiológicas, por exemplo, concentração na faixa entre cerca de 0,5 mM e cerca de 100 mM (por exemplo, 10 mM, 20 mM, 50 mM, etc.) e concentrações fisiológicas de sal (por exemplo, NaCl a cerca de 0,15 mM) e em um pH de 5,0-9,0.

A fase sólida é, de preferência, um glóbulo de agarose (por exemplo, Sepharose) ou partícula para imobilização do agente de ligação Fc. Em várias modalidades, a coluna é revestida com um reagente, tal como glicerol, para diminuir ou prevenir aderência não específica à coluna. Em 5 várias modalidades, o agente de ligação Fc é Proteína a. A coluna rmp Protein A Sepharose™ Fast Flow (FF), comercialmente disponível da Amersham Biosciences, é um exemplo de uma coluna de Proteína A adequada para uso nas metodologias caracterizadas.

O agente de ligação Fc é, então, lavado com uma solução de 10 lavagem tamponada contendo um sal catiônico divalente para remover espécies variantes d proteína ligadas à fase sólida ou agente de ligação Fc. Em particular, descobriu-se que o uso de uma etapa de lavagem com sal catiônico divalente pode remover uma quantidade significativa de impurezas indesejáveis. Especificamente, descobriu-se que variantes de transleitura de 15 íntron, variantes de baixo peso molecular e variantes ligadas sob dissulfeto de uma proteína alvo podem ser removidas usando uma lavagem com sal catiônico divalente. Além disso, proteínas de célula hospedeira (HCP) e DNA também podem ser removidos usando a lavagem com sal catiônico divalente. Exemplos de sais caotrópicos adequados incluem, mas não estão limitados a, 20 cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de níquel (NiCl_2) e cloreto de magnésio (MgCl_2). Embora um único sal catiônico divalente possa estar presente na solução de lavagem, em várias modalidades, dois ou mais sais catiônicos divalentes podem ser usados.

Em várias modalidades, soluções de lavagem, além da solução 25 de lavagem contendo sal catiônico divalente, são usadas para remover impurezas. Por exemplo, em várias modalidades, uma solução de Tris a 20 a 50 mM, NaCl a 0,75 a 2,0 M, pH de 5,0-9,0 e/ou uma solução de Tris a 10 mM, pH de 7,5, são usadas para lavar o agente de ligação Fc antes de, após ou antes e após lavagem do agente de ligação Fc com a solução de lavagem

contendo sal catiônico divalente.

Em várias modalidades, o sal catiônico divalente é, de preferência, adicionado em uma concentração entre cerca de 0,5 M e cerca de 2,5 M a uma solução de pH tamponada tendo um pH na faixa de cerca de 5 a cerca de 9 e, de preferência, um pH na faixa de cerca de 7 a cerca de 8. Concentrações preferidas do sal catiônico divalente incluem, mas não estão limitadas a, 0,6 M, 2,0 M e 2,5 M. Tampões adequados para essa finalidade incluem, mas não estão limitados a, tampões de Tris ou acetato em uma concentração de 20 a 50 mM.

Após a(s) etapa(s) de lavagem, a proteína alvo é recuperada do agente de ligação Fc. Isso é normalmente obtido usando um tampão de eluição adequado. A proteína alvo pode, por exemplo, ser eluída da coluna usando um tampão de eluição tendo um baixo pH, por exemplo, na faixa de cerca de 2 a cerca de 6,5 e, de preferência, na faixa de cerca de 2,5 a cerca de 3,5.

Em várias modalidades, a proteína alvo assim recuperada pode ser formulada em um veículo farmacêuticamente aceitável e usada para vários usos diagnósticos, terapêuticos ou outros conhecidos para tais moléculas. Em várias modalidades, o preparado de proteína alvo eluído pode ser submetido à etapas de purificação adicionais após a etapa de cromatografia do agente de ligação Fc. Por exemplo, etapas de purificação adicionais exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a: cromatografia de troca de ânions, cromatografia de troca de cátions, cromatografia por interação hidrofóbica (HIC), cromatografia em hidroxiapatita, diálise, cromatografia por afinidade (incluindo cromatografia por afinidade de metal imobilizado), cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), precipitação de sulfato de amônio, precipitação de etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatofocalização, ultrafiltração, diafiltração e filtração em gel. Em várias modalidades, a etapa de cromatografia de agente de ligação Fc é seguida por

uma etapa de cromatografia de troca de ânions e HIC. Em várias modalidades, as etapas de cromatografia são ainda seguidas por uma etapa de filtração de vírus, uma etapa de ultrafiltração/diafiltração e uma etapa de filtração de contaminante microbiano. Em várias modalidades, essas etapas de purificação
5 adicionais podem ser conduzidas antes da etapa de cromatografia de agente de ligação Fc. Em vários aspectos, os métodos aqui envolvem purificação de uma proteína contendo região Fc de impurezas através de cromatografia de Proteína A.

Em várias modalidades, métodos para purificação de uma
10 proteína contendo região Fc (a proteína de interesse) começam com adsorção da proteína alvo a um agente de ligação Fc compreendendo Proteína A imobilizada sobre uma fase sólida, seguido por lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas e, subsequente, remoção da proteína
15 da Proteína A para produzir um primeiro reservatório de eluente.

Em várias modalidades, o processo de purificação continua com sujeição do primeiro reservatório de eluente à cromatografia de troca de ânions através de contato de uma resina de troca de ânions com o primeiro reservatório de eluente, de modo que impurezas adsorvem à resina, enquanto
20 que a proteína alvo não adsorve à resina. Assim, a proteína alvo pode ser recuperada do escoamento para produzir um segundo reservatório de eluente. Em várias modalidades, a etapa de cromatografia de troca de ânions ainda compreende lavagem da resina de troca de ânions com uma solução de lavagem tamponada para recuperar pelo menos uma porção da proteína alvo
25 adsorvida, a qual poderia, então, ser combinada com o segundo reservatório de eluente. Alternativamente, o primeiro reservatório de eluente pode ser contatado com a resina de troca de ânions de uma forma tal que o anticorpo adsorve, permitindo que quaisquer impurezas escoem, opcionalmente seguido por lavagem e eluição do anticorpo adsorvido.

Em várias modalidades, o processo de purificação continua com sujeição do segundo reservatório de eluente à HIC através de adsorção da proteína alvo a uma resina de interação hidrofóbica (por exemplo, uma fase sólida funcionalizada com ligantes hidrofóbicos), lavagem da resina de interação hidrofóbica com uma solução de lavagem tamponada com uma resistência iônica a qual não elui substancialmente a proteína alvo e recuperação da proteína alvo (tipicamente usando um tampão de eluição com uma resistência iônica baixa o bastante para desabsorver a proteína alvo da resina de interação hidrofóbica) sobre um terceiro reservatório de eluente. Alternativamente, o segundo reservatório de eluente pode ser contatado com a coluna de HIC de uma forma tal que a proteína alvo não adsorve, recuperando a proteína alvo do escoamento como um terceiro reservatório de eluente.

Em várias modalidades, o processo de purificação inclui uma ou mais etapas de filtração, por exemplo, para remover vírus, concentrar e tamponar a solução contendo a proteína alvo e para remover contaminantes microbianos.

Em várias modalidades, a presente invenção proporciona métodos para a purificação de uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas, onde as impurezas compreendem uma ou mais variantes de IRT. Em uma modalidade, os métodos proporcionam uma redução de cerca de 2 a cerca de 20 vezes nos níveis de variantes de IRT com relação àqueles no líquido fonte. De preferência, níveis de variante de IRT são reduzidos em pelo menos 5 vezes e, mais preferivelmente, os níveis de variantes de IRT são reduzidos em pelo menos 10 vezes. Por exemplo, em um líquido fonte (amostra inicial) tendo cerca de 3-5% de variantes de anticorpo de IRT (como um percentual de espécies totais no líquido fonte), espécies variantes de anticorpo de IRT podem ser reduzidas para cerca de 0,3 a cerca de 0,5%. Em várias modalidades, espécies variantes de IRT são reduzidas para: menos de 1%,

menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,1%. De preferência, na purificação de um líquido fonte para o preparo de uma proteína, variantes de IRT são reduzidas para: menos de 1%, menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,1% como um percentual de espécies totais no líquido fonte.

Em várias modalidades, a presente invenção proporciona métodos para a purificação de uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas onde as impurezas compreendem uma ou mais variantes de LMW. Em uma modalidade, os métodos proporcionam uma redução de cerca de 2 a cerca de 20 vezes nos níveis de variantes de LWM com relação àqueles no líquido fonte. De preferência, os níveis de variantes de LMW são reduzidos em pelo menos 5 vezes e, mais preferivelmente, os níveis de variantes de LMW são reduzidos em pelo menos 10 vezes.

Por exemplo, em um líquido fonte (amostra inicial) tendo cerca de 20% de variantes de anticorpo de UDB (como um percentual de espécies totais no líquido fonte), espécies variantes de anticorpo de UDB podem ser reduzidas para cerca de 10% a cerca de 2%. Em várias modalidades, espécies variantes de UDB são reduzidas para: menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% ou menos de 1%. De preferência, na purificação de um líquido fonte para o preparo de uma proteína, variantes de UDB são reduzidas para: menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% ou menos de 1% como um percentual de espécies totais no líquido fonte.

Por exemplo, em um líquido fonte (amostra inicial) tendo cerca de 3-5% de variantes de anticorpo de LMW (como um percentual de espécies totais no líquido fonte), espécies variantes de anticorpo de LMW podem ser reduzidas para cerca de 0,3 a cerca de 0,5%. Em várias modalidades, espécies variantes de MLW são reduzidas para: menos de 1%,

menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,15. De preferência, na purificação de um líquido fonte para o preparo de uma proteína, variantes de LMW são reduzidas para: menos de 1%, menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,1% como um percentual de espécies totais no líquido fonte.

Em várias modalidades, a presente invenção proporciona métodos para a purificação de uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas onde as impurezas compreendem uma ou mais variantes de UDB. Em uma modalidade, os métodos proporcionam uma redução de cerca de 2 a cerca de 20 vezes nos níveis de variantes de UDB com relação àqueles no líquido fonte. De preferência, os níveis de variantes de UDB são reduzidos em pelo menos 5 vezes e, mais preferivelmente, os níveis de variantes de UDB são reduzidos em pelo menos 10 vezes.

Por exemplo, em um líquido fonte (amostra inicial) tendo cerca de 20% de variantes de anticorpo de UDB (como um percentual de espécies totais no líquido fonte), espécies variantes de anticorpo de UDB podem ser reduzidas para cerca de 10% a cerca de 2%. Em várias modalidades, espécies variantes de UDB são reduzidas para: menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% ou menos de 1%. De preferência, na purificação de um líquido fonte para o preparo de uma proteína, variantes de UDB são reduzidas para: menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% ou menos de 1% como um percentual de espécies totais no líquido fonte.

Também, por exemplo, em um líquido fonte (amostra inicial) tendo cerca de 3-5% de variantes de anticorpo de UDB (como um percentual de espécies totais no líquido fonte), espécies variantes de anticorpo de UDB podem ser reduzidas para cerca de 0,3 a cerca de 0,5%. Em várias modalidades, espécies variantes de UDB são reduzidas para: menos de 1%,

menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,1%. De preferência, na purificação de um líquido fonte para o preparo de uma proteína, variantes de UDB são reduzidas para: menos de 1%, menos de 0,8%, menos de 0,5%, menos de 0,3%, menos de 0,2% e/ou menos de 0,1% como um percentual de espécies totais no líquido fonte.

Proteínas para Uso nos Métodos de Purificação da Invenção

A proteína tendo uma região Fc a ser purificada de acordo com a invenção conforme descrito aqui é preparada usando métodos os quais são bem estabelecidos na técnica e incluem, por exemplo, técnicas sintéticas (tais como técnicas recombinantes e síntese de peptídeo ou uma combinação dessas técnicas) ou pode ser isolada de uma fonte endógena da proteína. Em determinadas modalidades da invenção, a proteína tendo uma região Fc é um polipeptídeo de ligação a antígeno, mais preferivelmente um anticorpo. O anticorpo pode ser, por exemplo, um preparado de anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano. Técnicas para a produção de um polipeptídeo de ligação a antígeno e, em particular, anticorpos, são descritos abaixo. alternativamente, a proteína tendo uma região Fc pode ser uma forma modificada de um anticorpo, tal como um anticorpo biespecífico, um conjugado de anticorpo ou uma proteína de fusão de anticorpo (por exemplo, uma proteína de fusão Fc). Técnicas para a produção de tais formas modificadas de anticorpos e proteínas de fusão de anticorpo também são descritas abaixo.

Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais podem ser preparados através de imunização de um indivíduo adequado com um imunogênio. A titulação de anticorpo no indivíduo imunizado pode ser monitorada ao longo do tempo através de técnicas padrões, tal como com um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) usando antígeno alvo imobilizado. Se desejado, as

moléculas de anticorpo dirigidas contra o antígeno alvo podem ser isoladas do mamífero (por exemplo, do sangue) e ainda purificadas através de técnicas bem conhecidas, tal como cromatografia de Proteína A Sepharose, para obter a fração de anticorpo, por exemplo, IgG. Em um momento apropriado após imunização, por exemplo, quando as titulações de anticorpo anti-antígeno estão mais altas, células que produzem anticorpo podem ser obtidas do indivíduo e usadas para preparar anticorpos monoclonais através de técnicas padrões, tal como a técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497) (veja também Brown e colaboradores (1981) *J. Immunol.* 127: 539-46; Brown e colaboradores (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4980-83; Yeh e colaboradores (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2927-31; e Yeh e colaboradores (1982) *Int. J. Cancer* 29: 269-75). Para o preparo de anticorpos policlonais quiméricos, veja Buechler e colaboradores, Patente U.S. 6.420.113.

Anticorpos Monoclonais

Qualquer um dos muitos protocolos conhecidos usados para fusão de linfócitos e linhagens de células imortalizadas pode ser aplicado para fins de geração de um anticorpo monoclonal (veja, por exemplo, G. Galfre e colaboradores (1977) *Nature* 266:55052; Gefter e colaboradores. *Somatic Cell Genet*, cited supra; Lerner, Yale *J. Biol. Med.*, citado supra; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado supra). Além disso, aqueles habilitados na técnica apreciarão que existem muitas variações de tais métodos as quais também seriam úteis. Tipicamente, a linhagem de célula imortalizada (por exemplo, uma linhagem de célula de mieloma) é derivada da mesma espécie de mamífero que os linfócitos. Por exemplo, hibridomas de murino podem ser feitos através de fusão de linfócitos de um camundongo imunizado com um preparado imunogênico da presente invenção a uma linhagem de célula de camundongo imortalizada. Linhagens de células imortais preferidas são linhagens de células de mieloma de camundongo que são sensíveis a um meio

de cultura contendo hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio de HAT"). Qualquer uma de uma série de linhagens de células de mieloma pode ser usada como um parceiro de fusão de acordo com técnicas padrões, por exemplo, as linhagens de células de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 ou Sp2/O-Ag14. Essas linhagens de mieloma estão disponíveis da ATCC. Tipicamente, células de mieloma HAT-sensíveis são fundidas a esplenócitos de camundongo usando polietileno glicol ("PEG"). Células de hibridoma resultantes da fusão são, então, selecionadas usando meio de HAT, o qual mata células de mieloma não fundidas e improdutivamente fundidas (esplenócitos não fundidos morrem após vários dias porque eles não são transformados). Células de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal da invenção são detectados através de seleção dos sobrenadantes de cultura de hibridoma para anticorpos que se ligam a um antígeno alvo usando um ensaio ELISA padrão.

15 **Anticorpos recombinantes**

Alternativamente ao preparo de hibridomas que secretam anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal pode ser identificado e isolado através de seleção de uma biblioteca de imunoglobulina combinatorial recombinante (por exemplo, uma biblioteca de Phage display de anticorpo) com um antígeno alvo para, dessa forma, isolar membros da biblioteca de imunoglobulina que se ligam ao antígeno alvo. Kits para geração e seleção de bibliotecas de Phage display estão comercialmente disponíveis (por exemplo, o Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catálogo No. 27-9400-01; e o Stratagene SurβAP™ Phage Display Kit, Catálogo No. 240612). Adicionalmente, exemplos de métodos e reagentes particularmente passíveis de uso na geração e seleção de uma biblioteca de visualização de anticorpo podem ser encontrados, por exemplo, em Ladner e colaboradores, Patente U.S. 5.223.409; Kang e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. WO 92/18619; Dower e colaboradores, Publicação PCT Internacional No.

WO 91/17271; Winter e colaboradores, Publicação PCT Internacional WO 92/20791; Markland e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. WO 92/15679; Breitling e colaboradores, Publicação PCT Internacional WO 93/01288; McCafferty e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. 5 WO 92/01047; Garrard e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. WO 92/09690; Ladner e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. WO 90/02809; Fuchs e colaboradores (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay e colaboradores (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse e colaboradores (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths e colaboradores 10 (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins e colaboradores (1992) *J Mol. Biol.* 226: 889-896; Clarkson e colaboradores (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram e colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrad e colaboradores (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom e colaboradores (1991) *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; Barbas e colaboradores 15 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982; e McCafferty e colaboradores, *Nature* (1990) 348: 552-554.

Anticorpos Quiméricos e Humanizados

Adicionalmente, anticorpos recombinantes, tais como anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, compreendendo porções 20 humanas e não-humanas, os quais podem ser feitos usando técnicas de DNA recombinante padrões, estão dentro do escopo da invenção.

O termo "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" se refere a uma imunoglobulina ou anticorpo que inclui pelo menos uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo humanizada (isto é, pelo 25 menos uma cadeia leve ou pesada humanizada). O termo "cadeia de imunoglobulina humanizada" ou "cadeia de anticorpo humanizada" (isto é, uma "cadeia leve de imunoglobulina humanizada" ou "cadeia pesada de imunoglobulina humanizada) se refere a uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo (isto é, uma cadeia leve ou pesada, respectivamente) tendo uma

região variável que inclui uma região de estrutura variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humano e regiões de determinação de complementaridade (CDRs) (por exemplo, pelo menos uma CDR, de preferência duas CDRs, mais preferivelmente três CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não-humano e ainda inclui regiões constantes (por exemplo, pelo menos uma região constante ou porção da mesma, no caso de uma cadeia leve, e três regiões constantes no caso de uma cadeia pesada). O termo "região variável humanizada" (por exemplo, "região variável de cadeia leve humanizada" ou "região variável de cadeia pesada humanizada") se refere a uma região variável que inclui uma região de estrutura variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humano e regiões de determinação de complementaridade (CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não-humano.

A expressão "substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humano" ou "substancialmente humano" significa que, quando alinhada com uma seqüência de aminoácido de imunoglobulina ou anticorpo humano para fins de comparação, a região compartilha pelo menos 80-90%, 90-95% ou 95-99% de identidade (isto é, identidade de seqüência local) com a estrutura ou seqüência de região constante humana permitindo, por exemplo, que substituições conservativas, substituições de seqüência de consenso, substituições de linhagem germinativa, mutações invertidas e semelhantes. A introdução de substituições conservativas, substituições de seqüência de consenso, substituições de linhagem germinativa e semelhantes é, freqüentemente, referida como "otimização" de um anticorpo ou cadeia humanizada. A expressão "substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não-humano" ou "substancialmente não-humano" significa ter uma seqüência de imunoglobulina ou anticorpo pelo menos 80-95%, de preferência pelo menos 90-95%, mais preferivelmente 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica àquela de um organismo não-humano, por exemplo, um

mamífero não-humano.

Conseqüentemente, todas as regiões ou resíduos de uma imunoglobulina ou anticorpo humanizado ou de uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo humanizado, exceto as CDRs, são substancialmente idênticas às regiões ou resíduos correspondentes de uma ou mais seqüências de imunoglobulina humana nativa. O termo "região correspondente" ou "resíduo correspondente" se refere a uma região ou resíduo sobre uma segunda seqüência de aminoácido ou nucleotídeo o qual ocupa a mesma (isto é, equivalente) posição que uma região ou resíduo sobre uma primeira seqüência de aminoácido ou nucleotídeo, quando as primeira e segunda seqüências são otimamente alinhadas para fins de comparação.

O termo "identidade significativa" significa que duas seqüências de polipeptídeo, quando otimamente alinhadas, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT usando os pesos por gap de default, compartilham pelo menos 50-60% de identidade de seqüência, de preferência pelo menos 60-70% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 70-80% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 80-90% de identidade de seqüência, ainda mais preferivelmente pelo menos 90-95% de identidade de seqüência ou mais. O termo "identidade substancial" significa que duas seqüências de polipeptídeo, quando otimamente alinhadas, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT usando pesos por gap de default, compartilham pelo menos 80-90% de identidade de seqüência, de preferência pelo menos 90-95% de identidade de seqüência e, mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade de seqüência ou mais (por exemplo, 99% de identidade de seqüência ou mais). Para comparação de seqüência, tipicamente, uma seqüência atua como uma seqüência de referência com a qual seqüências de teste são comparadas. Quando do uso de um algoritmo de comparação de seqüência, as seqüências de teste e de referência são inseridas em um computador, coordenadas de sub-seqüência

são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequência, então, calcula a identidade de sequência percentual para a(s) sequência(s) de teste com relação à sequência de referência, baseado nos parâmetros de programa designados.

Alinhamento opcional de seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, através do algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), através do algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), através do método de busca por similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), através de implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou através de inspeção visual (veja, de modo geral, Ausubel e colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*). Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinação da identidade percentual de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, o qual é descrito em Altschul e colaboradores, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990). Software para realização de análises pelo BLAST está publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information (publicamente acessível através do servidor da internet do National Institutes of Health NCBI). Tipicamente, os parâmetros de default do programa podem ser usados para realizar a comparação de sequência, embora parâmetros padronizados também possam ser usados. Para seqüências de aminoácido, o programa BLASTP usa, como defaults, uma extensão de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de escore BLOSUM62 (veja Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)).

De preferência, posições de resíduo as quais não são idênticas diferem por substituições conservativas de aminoácido. Para fins de

classificação de substituições de aminoácido como conservativas ou não conservativas, aminoácidos são agrupados como segue: Grupo I (cadeias laterais hidrofóbicas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadeias laterais hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadeias laterais ácidas): asp, glu; 5 Grupo IV (cadeias laterais básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (resíduos que influenciam a orientação de cadeia): gly, pro; e Grupo VI (cadeias laterais aromáticas): trp, tyr, phe. Substituições conservativas envolvem substituições entre aminoácidos na mesma classe. Substituições não conservativas constituem troca de um membro de uma dessas classes por um membro de 10 outra.

De preferência, imunoglobulinas ou anticorpos humanizados se ligam ao antígeno com uma afinidade que está dentro de um fator de três, quatro ou cinco daquele do anticorpo não humanizado correspondente. Por exemplo, se o anticorpo não humanizado tem uma afinidade de ligação de 10^{-9} 15 M, anticorpos humanizados terão uma afinidade de ligação de pelo menos 3×10^{-8} M, 4×10^{-8} M, 5×10^{-8} M ou 10^{-9} M. Uma cadeia de imunoglobulina é dita como tendo "dirigindo a ligação antígeno" quando ela confere, a uma imunoglobulina ou anticorpo intacto (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo), uma propriedade de ligação ou afinidade de ligação específica. Uma 20 mutação (por exemplo, uma mutação invertida) é dita como afetando substancialmente a capacidade de uma cadeia pesada ou leve de dirigir a ligação se ela afeta (por exemplo, diminui) a afinidade de ligação de uma imunoglobulina ou anticorpo intacto (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) compreendendo a referida cadeia em pelo menos uma ordem de 25 magnitude comparada com aquela do anticorpo (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) compreendendo uma cadeia equivalente carecendo da referida mutação. Uma mutação "não afeta substancialmente (por exemplo, diminui) a capacidade de uma cadeia de dirigir a ligação a antígeno" se ela afeta (por exemplo, diminui) a afinidade de ligação de uma imunoglobulina

ou anticorpo intacto (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) compreendendo a referida cadeia em apenas um fator de dois, três ou quatro daquele do anticorpo (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) compreendendo uma cadeia equivalente carecendo da referida mutação.

5 O termo imunoglobulina ou anticorpo "quimérico" se refere a uma imunoglobulina ou anticorpo cujas regiões variáveis derivam de uma primeira espécie e cujas regiões constantes derivam de uma segunda espécie. Imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos podem ser construídos, por exemplo, através de manipulação genética, a partir de segmentos de gene de
10 imunoglobulina pertencendo a diferentes espécies. Os termos "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" não se destinam a abranger imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, conforme definido infra. Embora imunoglobulinas ou anticorpos humanizados sejam quiméricos quanto à sua construção (isto é, compreendam regiões de mais de uma espécie
15 de proteína), eles incluem características adicionais (isto é, regiões variáveis compreendendo resíduos de CDR doadores e resíduos de estrutura aceitadores) não encontradas em imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, conforme definido aqui.

Tais anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados
20 podem ser produzidos através de métodos de DNA recombinante conhecidos na técnica, por exemplo, usando os métodos descritos em Robinson e colaboradores. Pedido Internacional No. PCT/US86/02269; Akira e colaboradores, Pedido de Patente Européia 184.187; Taniguchi, M., Pedido de Patente Européia 171.496; Morrison e colaboradores, Pedido de Patente
25 Européia 173.494; Neuberger e colaboradores, Publicação PCT Internacional No. WO 86/01533; Cabilly e colaboradores, Patente U.S. 4.816.567; Cabilly e colaboradores, Pedido de Patente européia 125.023; Better e colaboradores (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu e colaboradores (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu e colaboradores (1987) *J Immunol.* 139: 3521-

3526; Sun e colaboradores (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura e colaboradores (1987) *Canc. Res.* 47: 999-1005; Wood e colaboradores (1985) *Nature* 314: 446-449; e Shaw e colaboradores (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi e colaboradores (1986) *BioTechniques* 4: 214; Winter, Patente U.S. 5.225.539; Jones e colaboradores (1986) *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan e colaboradores (1988) *Science* 239: 1534; e Beidler e colaboradores (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

Anticorpos Humanos de Animais Transgênicos e Phage Display

10 Alternativamente, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, quando de imunização, de produzir um repertório total de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada de anticorpo (JH) em camundongos quiméricos e mutantes para a linhagem germinativa resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. Transferência do arranjo de gene de imunoglobulina de linhagem germinativa humana para tais camundongos mutantes para a linhagem germinativa resulta na produção de anticorpos humanos quando de estímulo com antígeno. Veja, 20 por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.150.584; 6.114.598; e 5.770.429.

Anticorpos totalmente humanos também podem ser derivados de bibliotecas de "Phage display" (Hoogenboom e colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks e colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 222: 581- 597 (1991)). Anticorpos policlonais quiméricos também podem ser obtidos de 25 bibliotecas de "Phage display" (Buechler e colaboradores, Patente U.S. 6.420.113).

Anticorpos Biespecíficos e Conjugados de Anticorpo

Anticorpos biespecíficos (BsAbs) são anticorpos que têm especificidades de ligação por pelo menos dois epítopos diferentes. Tais

anticorpos podem ser derivados de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab)'₂). Métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm diferentes especificidades (Millstein e colaboradores, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Em virtude da seleção aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de diferentes moléculas de anticorpo (veja WO 93/08829 e em Traunecker e colaboradores, *EMBO J*, 10: 3655-3659 (1991)).

Anticorpos biespecíficos também incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina ou outra carga útil. Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica e são discutidos na Pat. U.S. No. 4.676.980, junto com uma série de técnicas de reticulação.

Em outra modalidade, o anticorpo pode ser conjugado, química ou geneticamente, a uma carga útil tal como uma porção reativa, detectável ou funcional, por exemplo, uma imunotoxina, para produzir um conjugado de anticorpo. Tais cargas úteis incluem, por exemplo, imunotoxinas, produtos quimioterapêuticos e radioisótopos, todos os quais são bem conhecidos na técnica.

25 ***Proteínas de fusão de anticorpo***

Uma proteína tendo uma região Fc, conforme usado na invenção, pode ser uma proteína de fusão que contém pelo menos uma porção Fc de um anticorpo fundida a uma proteína ou polipeptídeo de não-anticorpo. Por exemplo, a região Fc pode ser fundida a um ligante para um receptor, de

modo que uma proteína de fusão solúvel é criada a qual é capaz de ligação ao receptor e que tem funções Fc-relacionadas (tais como estabilidade no soro, ligação a receptor de Fc e semelhantes). Alternativamente, a região Fc pode ser fundida ao domínio extracelular de um receptor, de modo que uma

5 proteína de fusão solúvel é criada, a qual é capaz de ligação ao ligante para o receptor (desse modo, competindo com o receptor nativo) e que tem funções Fc-relacionadas. Um exemplo não limitativo de tal proteína de fusão Fc é etanercept (Embril®), o qual compreende o domínio de ligação a ligante extracelular do receptor de TNF α humano fundido à porção Fc de IgG₁

10 humana. Proteínas de fusão de anticorpo (também referidas na técnica como proteínas de fusão de Fc ou proteínas de fusão de Ig) podem ser preparadas usando técnicas de DNA recombinante padrões e foram descritas na técnica, veja, por exemplo, Patente U.S. 5.116.964, Patente U.S. 5.225.538, Patente U.S. 5.336.603 e Patente U.S. 5.428.130, todas por Capon e colaboradores.

15 *Anticorpos anti-IL-13*

Em uma modalidade preferida, a proteína tendo um região Fc a ser purificada de acordo com a invenção é um anticorpo anti-IL-13. Anticorpos anti-IL-13 são descritos nos pedidos Provisórios de Patente Nos. de Série 60/578.473, depositado em 9 de Junho de 2004 e 60/581.375,

20 depositado em 22 de Junho de 2004, ambos intitulados "Antibodies against human IL-13 and uses thereof". Os conteúdos desses pedidos são incorporados por referência. Um anticorpo anti-IL-13 preferido pode ser variadamente referido aqui como "IMA".

Anticorpos que são capazes de ligação a, neutralização e/ou

25 inibição de uma ou mais atividades IL-13-associadas, particularmente a atividade de sinalização de IL-13, são úteis para tratamento de doenças mediadas pela IL-13, tais como asma alérgica, asma não alérgica e patologias relacionadas à asma, tais como fibrose, eosinofilia e produção de muco.

Agentes de ligação à IL-13 que são antagonistas de IL-12,

incluindo anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam à IL-13, em particular IL-13 humana, com elevada afinidade e especificidade. Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da presente divulgação são também referidos aqui como "anticorpos anti-IL-13" e "fragmentos dos mesmos", respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo anti-IL-13 ou fragmento do mesmo reduz, neutraliza e/ou antagoniza pelo menos uma atividade IL-13-associada. Por exemplo, o anticorpo anti-IL-13 ou fragmento do mesmo pode se ligar à IL-13, por exemplo, um epítopo de IL-13, e interferir com uma interação, por exemplo, ligação, entre a IL-13 e um complexo de receptor de IL-13 ("IL-13R"), por exemplo, um complexo compreendendo receptor de IL-13 ("IL-13R α 1") e a cadeia alfa do receptor de interleucina-4 ("IL-4R α ") ou uma subunidade da mesma (por exemplo, IL-13R α 1 ou IL4-R α , individualmente). Assim, os anticorpos e fragmentos dos mesmos descritos aqui podem ser usados para interferir com (por exemplo, inibir, bloquear ou de outro modo reduzir) uma interação, por exemplo, ligação, entre a IL-13 e um complexo de receptor de IL-13, ou uma subunidade do mesmo, desse modo, interferindo com a formação de um complexo de sinalização funcional.

Outras Proteínas Contendo Região Fc Preferidas

Em outra modalidade preferida, a proteína tendo uma região Fc a ser purificada de acordo com a invenção é um anticorpo anti-A β . Anticorpos anti-A β são descritos na Publicação PCT No. WO 2002/46237 e Publicação U.S. No. 20050118651, ambas intituladas "Humanized antibodies that recognize beta amyloid peptide". Os conteúdos desses pedidos são incorporados por referência. Anticorpos anti-A β preferidos podem ser variadamente referidos como "AAB" e "12A11" aqui.

Outras proteínas contendo região Fc preferidas incluem anticorpos que foram aprovados para uso terapêutico em seres humanos. tais anticorpos incluem anticorpos que se ligam a um antígeno de célula

tumorigena, anticorpos que se ligam a uma citocina, anticorpos que se ligam a um receptor de citocina e anticorpos que se ligam a uma proteína de adesão. Conseqüentemente, em várias modalidades, uma proteína contendo uma região Fc pode ser um anticorpo ou uma proteína de fusão Fc que se liga a um antígeno selecionado do grupo consistindo de CD3 (por exemplo, OKT3), CD52 (por exemplo, alemtuzumab; Campath®), VEGF (por exemplo, bevacizumab; Avastin®), EGFR (por exemplo, cetuximab; Erbitux®), CD33 (por exemplo, gemtuzumab; Mylotarg®), CD20 (por exemplo, rituximab; Rituxan®; tositumomab; Bexxar®; ibritumomab; Zevalin®), HER-2 (por exemplo, trastuzumab; Herceptin®), TNF α (por exemplo, adalimumab; Humira®, infliximab; Remicade®, etanercept; Embrel®), CD25 (e.g., daclizumab; Zenapax®, basiliximab; Simulect®), RSV (por exemplo, palivizumab; Synagis®), IgE (por exemplo, omalizumab; Xolair®), gp IIb/IIIa (por exemplo, abciximab; Reopro®), CD11a (por exemplo, efalizumab; Raptiva®) e integrina $\alpha 4$ (por exemplo, natalizumab; Tysabri®).

Deve ser compreendido que qualquer uma das moléculas de polipeptídeo precedentes, sozinhas ou em combinação, são adequadas para preparo como proteínas contendo região Fc de acordo com a invenção.

Vários aspectos e modalidades da presente invenção são ainda descritos à guisa de Exemplos a seguir. Os Exemplos são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são oferecidos para fins ilustrativos apenas. Exemplos são proporcionados usando três anticorpos monoclonais diferentes (referidos como AAB, 12A11 e IMA). Oito experimentos distintos são descritos, cada um representando uma combinação de anticorpo e remoção de impureza.

Materiais e métodos

Em geral, a prática da presente invenção emprega, a menos

que de outro modo indicado, técnicas convencionais de química, biológica molecular, tecnologia de DNA recombinante, imunologia (especialmente, por exemplo, tecnologia de imunoglobulina) e técnicas padrões em eletroforese. Veja, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Antibody Engineering Protocols* (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., M Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow e colaboradores, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel e colaboradores, John Wiley & Sons (1992). Bousse e colaboradores, Protein Sizing on a Microchip, *Anal. Chem.* 73, 1207-1212 (2001); Knapp e colaboradores, Commercialized and Emerging Lab-on-a-Chip Applications; em: *Proceedings of the μ TAS 2001 Symposium*, Ramsey, J.M. & van den Berg, A., 7-10 (2001); e Mhatre e colaboradores, Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 13 (24) 2503-2510 (1999).

Produção de proteína alvo

As proteínas contendo Fc alvo podem ser produzidas através de métodos de expressão padrões, por exemplo, usando uma linhagem de célula de mamífero recombinante em cultura em suspensão. Meio condicionado contendo a proteína contendo Fc de interesse é gerado em um bioreator de produção. O produto resultante pode ser coletado e clarificado com qualquer etapa de clarificação apropriada tal como, por exemplo, microfiltração e filtração ou centrifugação a 0,22 μ m, filtração em bloco absorvente e filtração a 0,22 μ m.

Purificação de proteína alvo

A purificação dos anticorpos monoclonais alvo exemplificados aqui (AAB, 12A11 e IMA) consiste de captura da molécula alvo sobre a cromatografia de afinidade de Proteína A. Essa pode consistir de rmp Protein

A Sepharose™ Fast Flow, Protein A Sepharose™ Fast Flow ou MabSelect Protein A. A resina é, então, lavada conforme descrito para cada um dos experimentos e o produto eluído e testado com relação aos níveis de impureza.

5 Análise de proteína alvo

HPLC de fase inversa (RP-HPLC) foi usada para quantificar a quantidade de IRT presente nas amostras de anticorpo monoclonal AAB, enquanto que um método de Pro A HPLC foi empregado para determinar os níveis de IRT para o anticorpo monoclonal IMA. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC) foi usada para determinar o percentual de proteína monomérica (IgG monomérica), espécies de elevado peso molecular (HMW) e baixo peso molecular (LMW). Análise por SEC-HPLC de desnaturação foi realizada para determinar a quantidade relativa de espécies ligadas sob dissulfeto (UDB) nas amostras. Os níveis de HCP nas amostras de teste foram

10 de tamanho (SEC-HPLC) foi usada para determinar o percentual de proteína monomérica (IgG monomérica), espécies de elevado peso molecular (HMW) e baixo peso molecular (LMW). Análise por SEC-HPLC de desnaturação foi realizada para determinar a quantidade relativa de espécies ligadas sob dissulfeto (UDB) nas amostras. Os níveis de HCP nas amostras de teste foram

15 determinados usando um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA).

Ensaios analíticos: IRT & UDB

HPLC de Fase inversa (análise de IRT em AAB)

A RP-HPLC foi conduzida como segue. Redução de dissulfeto de cada amostra foi realizada através de incubação a 40°C durante 60 min na

20 presença de DTT a 2,5 mM.

Alquilação foi realizada através de incubação em temperatura ambiente na presença de ácido iodoacético a 5,5 mM. Após redução e alquilação, todas as amostras foram resfriadas rapidamente com 5 µl de DTT a 1 M. O limite de quantificação para esse ensaio é de 0,5%.

25 Aproximadamente 40 µg de cada uma das amostras alquiladas reduzidas foram injetados sobre uma coluna POROS R1/H RP-HPLC e trabalhadas durante 70 min sob as seguintes condições:

Coluna: Poros R1/H RP-HPLC

Temp. da coluna: 50 °C

Fase móvel A: TFA a 0,1% (peso/v) em água

Fase móvel B: TFA a 0,1% (peso/v) em acetonitrila a 95%

Taxa de fluxo: 1,0 mL/min

Deteção: 217 nm

5 Tempo de operação: 70 minutos

Injeção: Triplicata de 40 µg cada

Os tempos de gradiente foram conforme listados na TABELA

1.

Tabela 1: Tempos de gradiente para o método de RP-HPLC

Tempo de gradiente	% A	% B
0-1	95	5
2	70	30
54	60	40
55,1-70	95	5

10 **HPLC de Proteína A (análise de IRT em IMA)**

A HPLC de Proteína A foi conduzida como segue. Um total de 100 µg por injeção sobre a coluna POROS Pro A em temperatura ambiente durante 35 minutos foi realizado sob as seguintes condições:

Coluna: Poros Pro A 4,6 x 50 mm

15 Temp. da coluna: ambiente

Fase móvel A: formato de amônio a 50 mM, pH de 6,0

Fase móvel B: formato de amônio a 10 mM, ácido fórmico a 0,8%

Taxa de fluxo: 2,0 mL/min

20 Deteção: 280 nm

Tempo de operação: 35 minutos

Injeção: Triplicata de 100 µg cada

Os tempos de gradiente foram conforme listado na Tabela 2.

Tabela 2: Tempos de gradiente para coluna Pro A

Tempo de gradiente	% A	% B
0-5	100	0
25-30	55	45
30,5-35	100	0

dSEC-HPLC (análise de UDB em AAB)

SEC-HPLC de desnaturação foi conduzida como segue. O pré-tratamento de amostras para o ensaio SEC de desnaturação envolve uma mistura de reagente/amostra em concentrações finais de 200 µg/mL de proteína, HCl de guanidina a 3 M e Tris a 100 mM, em um pH de 7,4. As amostras foram aquecidas a 80°C durante 20 minutos, enquanto se misturava através de inversão. Para esse ensaio, dois controles são empregados para permitir um delineamento dos níveis de UDB. Referências internas com baixos e altos níveis de UDB foram usadas como controles. As condições Cromatográficas/de Ensaio foram como segue:

Coluna: TosohBioSep G3000 SWx1

Temp. da coluna: Ambiente

Fase móvel: HCl de guanidina a 3 M, NaPO₄ a 25 mM, pH de 6,8

Gradiente: isocrático

Taxa de fluxo: 0,5 mL/min

Deteção: 280 nm

Tempo de operação: 50 minutos

Injeção: triplicata 50 µL (10 µg)

EXEMPLO 1: Comparação de Tampões de Lavagem para Remoção de IRT (AAB)

Nesse exemplo, uma solução impura contendo o anticorpo monoclonal AAB foi purificada através de adsorção sobre uma coluna de Proteína A, seguido por uma primeira lavagem com tampão de lavagem contendo CaCl₂, MgCl₂, NaCl ou propileno glicol.

A cultura contendo o anticorpo monoclonal foi purificada em pequena escala usando uma coluna rmp Protein A Sepharose™ FF (8,9 mL) conectada a um sistema de cromatografia por FPLC GE Healthcare AKTA. Para todas as etapas de cromatografia em rmp Protein A Sepharose™ FF

descritas no experimento 1, as seguintes condições foram usadas. (Exceções são mencionadas nas descrições experimentais individuais).

Dimensões da coluna - 1,0 cm x 11,4 cm

Taxa de fluxo operacional - 150 cm/h

5 Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Fluxo - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (1 volume de coluna)

10 Lavagem 1 - variável (veja Tabela 3), exceto quanto à operação #1, a qual não teve lavagem 1

Lavagem 2 - Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Lavagem 3 - Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5 (7 volumes de coluna)

15 Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,1 (6 volumes de coluna)

Extração 1 - citrato de sódio a 20 mM, pH de 2,7 (5 volumes de coluna)

Extração 2 - HCl de guanidina a 6 M (2 volumes de coluna)

20 Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação - 2-8°C

25 As operações na coluna rmp Protein A Sepharose™ FF foram equilibradas com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A coluna foi carregada a aproximadamente 10 mg de produto/mL de resina. Carregamento foi seguido por fluxo de 1 volume de coluna com tampão de equilíbrio e 5 volumes de coluna de solução de lavagem 1. Todas as soluções de Lavagem 1 testadas são esboçadas na Tabela 3. Lavagem 1 foi

incluída em todas as operações, exceto quanto à operação #1. A lavagem 1 foi seguida por 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 e 7 volumes de coluna de Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5. O anticorpo monoclonal foi eluído da coluna com glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,1. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para 7,9-8,1 com Tris a 2 M, pH de 8,5. As colunas foram, então, retiradas, lavadas e armazenadas. A Tabela 3 lista os níveis das espécies de IRT & LMW presentes nos reservatórios de produto das várias operações.

Tabela 3: Valores de IRT e LMW para Vários tampões de Lavagem 1

Operação #	Condição	% LMW	% IRT
1	Controle (sem lavagem 1)	4,4	2,5
2	Propileno glicol a 20%, pH de 7,5	4,7	2,5
3	Tris a 50 mM, cloreto de magnésio a 2,0 M, pH de 7,5	1,6	1,5
4	Tris a 50 mM, cloreto de magnésio a 2,5 M, pH de 7,5	1,5	1,3
5	Acetato a 50 mM, cloreto de magnésio a 2,0 M, pH de 4,5	0,9	0,8
6	Tris a 50 mM, cloreto de sódio a 4,0 M, pH de 7,5	4,4	2,5
7	Tris a 50 mM, cloreto de cálcio a 2,0 m, pH de 7,5	1,8	1,4
8	Tris a 50 mM, cloreto de cálcio a 2,5 M, pH de 7,5	0,8	0,8

Os resultados mostraram que as lavagens com cloreto de magnésio e cloreto de cálcio reduziram os níveis de espécies de IRT e LMW, enquanto que as lavagens com cloreto de sódio e propileno glicol não reduziram as espécies de IRT ou LMW.

EXEMPLO 2: Cromatografia de Proteína A com Lavagem de CaCl_2 para Remoção de IRT

Nesse exemplo, uma purificação de anticorpo em maior escala foi realizada usando cromatografia de Proteína A com uma lavagem de CaCl_2 para remover espécies de IRT.

A cultura contendo anticorpo monoclonal foi purificada em escala piloto usando uma coluna de Proteína A MabSelect (2,4 L) conectada a um sistema de cromatografia Millipore K-Prime 400. As duas operações na MabSelect foram realizadas conforme descrito abaixo.

Dimensões da coluna - 13 cm x 18 cm

Taxa de fluxo operacional - 150 cm/h, 300 cm/h

Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Fluxo - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (2 volumes de coluna)

5 Lavagem 1 - Tris a 50 mM, CaCl_2 a 2 M, pH de 7,5 para operação #1 e nenhuma lavagem 1 para operação #2

Lavagem 2 - Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

10 Lavagem 3 - Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 25 mM, pH de 3,1 (6 volumes de coluna)

Extração 1 - glicina a 50 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 2,7 (5 volumes de coluna)

15 Extração 2 - HCl de guanidina a 6 M (2 volumes de coluna)

Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação - 2-8°C

20 A coluna de proteína A MabSelect foi equilibrada com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A coluna foi, então, carregada a aproximadamente 10 mg de produto/mL de resina. Isso foi seguido por um fluxo de 2 volumes de coluna com tampão de equilíbrio e 5 volumes de coluna de solução de lavagem 1. Essa solução de lavagem 1 consistia de Tris a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 7,5 para a operação 1, enquanto que foi deixada totalmente de fora para a operação 1. A lavagem 1 foi, então, seguida por 5 volumes de coluna de Tris a 50 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 e 5 volumes de coluna de Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5. O anticorpo monoclonal foi eluído da coluna de Proteína A MabSelect com

glicina a 50 mM, NaCl a 25 mM, pH de 3,1. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para 7,8-8,2 com Tris a 2 M, pH de 8,5. As colunas foram, então, retiradas, lavadas e armazenadas. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

5 **Tabela 4: Níveis % de IRT em operações em escala-piloto com e sem lavagem de cloreto de cálcio**

Operação #	Tampão de lavagem 1	% de IRT
1	Tris a 50 mM, CaCl ₂ 2 M, pH de 7,5	0,8
2	Controle (nenhum)	1,9

Os resultados mostraram que a lavagem com cloreto de cálcio em escala-piloto removeram IRT do reservatório de produto.

EXEMPLO 3: Remoção de IRT (IMA)

10 Nesse exemplo, um anticorpo monoclonal diferente (IMA) daquele usado no Exemplo 1 foi usado em uma purificação em pequena escala com uma lavagem de CaCl₂.

15 A cultura contendo o anticorpo monoclonal diferente (IMA) foi purificada em pequena escala usando uma coluna de Proteína A MabSelect (17,3 mL) conectada a um sistema de cromatografia GE Healthcare AKTA Explorer. A operação foi realizada conforme descrito abaixo.

Dimensões da coluna - 1,1 cm x 18,2 cm (17,3 mL)

Taxa de fluxo operacional - 300 cm/h

20 Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5,1 volumes de coluna)

Lavagem 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

25 Lavagem 2 - acetato de sódio a 50 mM, CaCl₂ a 0,6 M, pH de 5,0 (5 volumes de coluna)

Lavagem 3 - Tris a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5 (3 volumes de coluna)

Lavagem 4 - Tris a 10 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 3,0 (5 volumes de coluna)

5 Extração - HCl de guanidina a 6 M (5 volumes de coluna)

Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (6 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação - 18-24°C

10 A coluna de proteína A MabSelect foi equilibrada com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH de 7,5. A coluna foi carregada a aproximadamente 45 mg de produto/mL de resina. A coluna foi, então, lavada como segue: 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5, 5 volumes de coluna de acetato de sódio a 50 mM, CaCl₂ a 0,6 M, pH de 5,0, 3 volumes de coluna de Tris a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5
15 e 5 volumes de coluna de Tris a 10 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5. O produto foi eluído da coluna de proteína MabSelect com glicina a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 3,0. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para 7,7 com Tris a 2 M, pH de 8,0. A coluna foi, então, retirada, lavada e armazenada.
20 Os resultados são mostrados na Tabela 5, a qual proporciona os níveis de espécies de IRT na carga e pico.

Tabela 5: % de IRT na carga e pico em operação com lavagem com CaCl₂

% de IRT na carga	% de IRT no pico
5,8	1,1

25 Os resultados mostraram que a lavagem com CaCl₂ a 0,6 M proporcionou uma redução de IRT de 5 vezes.

EXEMPLO 4: Remoção de proteína de célula hospedeira (HCP)

Nesse exemplo, a capacidade de uma lavagem de CaCl₂ de remover proteína de célula hospedeira (HCP) de um preparado contendo o

anticorpo monoclonal IMA foi examinada.

A cultura contendo o anticorpo monoclonal foi purificada em pequena escala usando uma coluna de Proteína A MabSelect (19 mL) conectada a um sistema de cromatografia por FPLC GE Healthcare AKTA. As duas operações na MabSelect foram realizadas conforme descrito abaixo.

Dimensões da coluna - 1,1 cm x 20,0 cm (19 mL)

Taxa de fluxo operacional - 300 cm/h

Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5,0
10 volumes de coluna)

Lavagem 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Lavagem 2 - acetato de sódio a 50 mM, CaCl₂ a 0,6 M, pH de 5,0 (5 volumes de coluna; apenas para a operação 2)

Lavagem 3 - Tris a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5 (2
15 volumes de coluna)

Lavagem 4 - Tris a 10 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 3,0 (5
20 volumes de coluna)

Extração - HCl de guanidina a 6 M (5 volumes de coluna)

Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (6 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação - 18-24°C

A coluna de proteína A MabSelect foi equilibrada com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A coluna foi carregada a aproximadamente 45 mg de produto/mL de resina. A coluna foi, então, lavada com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 m, pH

de 7,5; para a Operação 2, uma lavagem adicional com 5 volumes de coluna de acetato de sódio a 50 mM, CaCl_2 a 0,6 M, pH de 5,0 foi usada. Antes de eluição, a coluna foi, então, lavada com 5 volumes de coluna de Tris a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5 e 5 volumes de coluna de Tris a 10 mM, NaCl a 5 mM, pH de 7,5. O produto foi eluído da coluna de Proteína A MabSelect com glicina a 50 mM, NaCl a 5 mM, pH de 3,0. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para um pH de 7,7 com Tris a 2 M, pH de 8,0. A coluna foi, então, retirada, laçada e armazenada. Os resultados são mostrados na Tabela 6, a qual proporciona o nível de espécies de HCP presentes na operação de controle e na operação lavada com CaCl_2 .

Tabela 6: Remoção de HCP com e sem lavagem com CaCl_2

Operação #	Condição de lavagem 2	HCP (PPM)
1	Nenhum (controle)	6.124
2	Acetato de sódio a 50 mM, CaCl_2 a 0,6 M, pH de 5,0	2.295

Os resultados mostraram que a lavagem com CaCl_2 proporcionam remoção 3 vezes maior de HCP quando comparado com a operação de controle.

15 **EXEMPLO 5: Remoção de DNA (AAB)**

A cultura contendo o anticorpo monoclonal foi purificada em pequena escala usando uma coluna de Proteína A MabSelect (19 mL) conectada a um sistema de cromatografia por FPLC GE Healthcare AKTA. As três operações na MabSelect foram realizadas conforme descrito abaixo.

20 Dimensões da coluna - 1,1 cm x 20 cm

Taxa de fluxo operacional - 300 cm/h

Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

25 Fluxo - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (2 volumes de coluna)

Lavagem 1 - Tris a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna (Operações 2 e 3 apenas)

Lavagem 2 - Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna) (Operações 1 e 3 apenas)

Lavagem 3 - Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5 (7 volumes de coluna)

5 Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,0 (6 volumes de coluna)

Extração - glicina a 50 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 2,7 (5 volumes de coluna)

10 Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação - 18-24°C

As operações na coluna de proteína A MabSelect foram equilibradas com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 15 7,5. As colunas foram, então, carregadas em uma carga de aproximadamente 40 mg de produto/mL de resina. Isso foi seguido por um fluxo de 2 volumes de coluna com tampão de equilíbrio. Para as operações 2 e 3, essa etapa foi seguida por 5 volumes de coluna de solução de Lavagem 1. Para as operações 1 e 3, 5 volumes de coluna de solução de Lavagem 2 foram usados. Todas as 3 20 operações empregaram 7 volumes de coluna de solução de Lavagem 3. O anticorpo monoclonal foi eluído da coluna de Proteína A MabSelect com glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,0. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para 7,5-8,0 com Tris a 2 M, pH de 8,5. As colunas foram, então, retiradas, lavadas e armazenadas. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

25 **Tabela 7: Remoção de DNA com lavagem de cloreto de cálcio**

Operação #	Lavagem 1	Lavagem 2	DNA (ng/mL)	DNA (ppm)
1	Nenhum (controle)	Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH de 7,5	3,6	0,37
2	Tris a 50 mM, CaCl ₂ a 2 M, pH de 7,5	Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH de 7,5	0,9	0,09
3	Tris a 50mM, CaCl ₂ a 2 M, pH de 7,5		0,3	0,03

Os resultados mostraram que a adição de Tris a 50 mM, cloreto de cálcio a 2,0 M, pH de 7,5 proporcionou uma redução 10 vezes maior de DNA comparado com o uso de NaCl na solução de lavagem.

EXEMPLO 6: Remoção de Proteína de Célula Hospedeira ((HCP) (12A11)

Nesse exemplo, um terceiro anticorpo monoclonal, 12A11, foi usado em operações de purificação nas quais várias condições de lavagem foram testadas com relação à capacidade de remover HCP.

Uma seleção de alto rendimento (HTS) em um formato de lâmina com filtro de 96 cavidades foi realizada para identificar as melhores condições de lavagem para remoção de impurezas, tal como HCP, para a etapa na MabSelect. Essa seleção variou os excipientes de lavagem, concentração de excipiente e pH para determinar seu efeito sobre as impurezas relacionadas ao processo, tal como HCP.

A resina MabSelect foi equilibrada usando Tris a 5 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,3 e carregada com produto em uma coluna. A resina foi, então, descondicionada, misturada e 50 µL de resina foram distribuídos a cada cavidade de uma lâmina com filtro de 96 cavidades. A resina em cada cavidade foi equilibrada com solução de Tris a 5 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,3 e, então, lavada com cada uma das várias soluções de lavagem de excipiente em 3 estágios, cada um usando 300 µL de tampão de lavagem. Após a lavagem com excipiente, uma segunda lavagem com tampão de Tris a 5 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,3 foi realizada em 4 estágios de 300 µL cada. O produto foi, então, eluído da resina em 3 estágios de 300 µL cada. Os estágios de eluição 1 e 2 foram combinados e testados com relação aos níveis de HCP.

Volume de resina - 50 µL

Excipientes de lavagem - cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio

Concentrações de excipiente - 100, 250, 500, 1000, 1500, e 2000 mM

pH do excipiente - 6,0 & 7,5

Tampões de eluição - Hepes a 25 mM, NaCl a 10 mM, pH de 3,0, Hepes a 25 mM, NaCl a 100 mM, pH de 3,0, glicina a 50 mM, NaCl a 10 mM, pH de 3,0, glicina a 50 mM, NaCl a 100 mM, pH de 3,0 e arginina a 100 mM, NaCl a 10 mM, pH de 3,0, arginina a 100 mM, NaCl a 100 mM, pH de 3,0

Temperatura de operação - 18-24°C

Os resultados são mostrados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Valores de HCP para resina MabSelect lavada com cloreto de sódio, cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio em um pH de 6,0

Tampão de eluição	Conc. de NaCl de eluição (mM)	Conc. de excipiente de lavagem (mM)	Excipiente de lavagem		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
Glicina a 50 mM	10	100	46.800	28.500	30.800
HEPES a 25 mM		250	35.300	17.900	22.000
Arginina a 100 mM		500	40.900	17.700	18.400
Glicina a 50 mM		1000	34.300	12.600	14.200
HEPES a 25 mM		1500	37.000	7.800	10.700
Arginina a 100 mM		2000	43.900	5.800	9.300

Tabela 9: Valores de HCP para resina MabSelect lavada com cloreto de sódio, cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio em um pH de 7,5

Tampão de eluição	Conc. de NaCl de eluição (mM)	Conc. de excipiente de lavagem (mM)	Excipiente de lavagem		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
Glicina a 50 mM	100	100	27.900	17.900	21.800
HEPES a 25 mM		250	24.700	16.600	18.200
Arginina a 100 mM		500	26.500	14.000	17.300
Glicina a 50 mM		1000	30.100	14.500	17.700
HEPES a 25 mM		1500	35.300	12.000	12.500
Arginina a 100 mM		2000	41.700	8.200	11.700

Os resultados mostraram que cloreto de cálcio e cloreto de magnésio reduziram o nível de HCP no reservatório de pico na MabSelect comparado com cloreto de sódio em um pH de 6,0 (Tabela 8) e pH de 7,5

(Tabela 9) em todas as concentrações de excipiente.

EXEMPLO 7: Remoção de espécies ligadas sob dissulfeto (UDB)

Nesse exemplo, a capacidade da lavagem de CaCl_2 de remover espécies ligadas sob dissulfeto (UDB) foi examinada.

5 Duas operações em rmp Protein A Sepharose™ FF foram realizadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 1.

Dimensões da coluna - 1,0 cm x 11,4 cm

Taxa de fluxo operacional - 150 cm/h

10 Equilíbrio 1 - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Fluxo - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (1 volume de coluna)

Lavagem 1 - acetato a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 5,0 para operação 1; nenhum para operação 2

15 Lavagem 2 - Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Lavagem 3 - Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5 (7 volumes de coluna)

20 Eluição - glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,1 (6 volumes de coluna)

Extração 1 - citrato de sódio a 20 mM, pH de 2,7 (5 volumes de coluna)

Extração 2 - HCl de guanidina a 6 M (2 volumes de coluna)

25 Lavagem de extração - Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Armazenamento - etanol a 16% (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação: 2-8°C

As colunas rmp Protein A Sepharose FF foram equilibradas com 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. As

colunas foram, então, carregadas em uma carga de aproximadamente 10 mg de produto/mL de resina. Isso foi seguido por um fluxo com 1 volume de coluna com tampão de equivalente e, então, 5 volumes de coluna de solução de lavagem 1. Essa solução de lavagem 1 consistia de acetato a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 5,0 para a operação 1, enquanto que foi deixada totalmente de fora para a operação 2. A lavagem 1 foi, então, seguida por 5 volumes de coluna de Tris a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 e 7 volumes de coluna de Tris a 10 mM, NaCl a 75 mM, pH de 7,5. O anticorpo monoclonal foi eluído da coluna rmp Protein A Sepharose™ FF com glicina a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH de 3,1. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para 7,8-8,2 com Tris a 2 M, pH de 8,5. As colunas foram, então, retiradas, lavadas e armazenadas. Os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: UDB % para amostras com e sem lavagem com cálcio

Operação #	Amostra	UDB %
1	Acetato a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 5,0	9,5
2	Nenhum (controle)	20,8

Uma redução de 2 vezes nos níveis de UDB foi observada para a operação que tinha a lavagem com acetato a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 5,0 adicional.

EXEMPLO 8: Remoção de HCP e IRT com Outras Lavagens de sal catiônico divalente (AAB)

Nesse exemplo, a capacidade de lavagens contendo MnCl_2 ou NiCl_2 de remover impurezas de um preparado contendo o anticorpo monoclonal AAB foi examinada.

Duas operações foram realizadas para avaliar o efeito de lavagens contendo outros sais catiônicos divalentes, tais como MnCl_2 e NiCl_2 . Duas operações de controle também foram realizadas - uma usando Tris a 50 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5 (sem remoção de IRT ou HCP esperada) e outra usando uma lavagem com Tris a 50 mM, CaCl_2 a 2,0 M, pH de 7,5.

A cultura contendo o anticorpo monoclonal foi purificada em

pequena escala usando uma coluna de Proteína A MabSelect (9 mL) conectada a um sistema de cromatografia por FPLC GE Healthcare AKTA. As operações na MabSelect foram realizadas conforme descrito abaixo. Conforme descrito abaixo, todos os parâmetros operacionais foram idênticos para as quatro operações, exceto quanto à Lavagem 1, a qual era variável (Tabela 11).

Dimensões da coluna - 1,0 cm x 11,5 cm (9 mL)

Taxa de fluxo operacional - 300 cm/h (Equilíbrio, Lavagem 2, Eluição, Regeneração, Armazenamento)

10 Taxa de fluxo operacional - 230 cm/h (Carga, Fluxo, Lavagem 1)

Equilíbrio 1 - Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 (5,0 volumes de coluna)

Lavagem 1 - Variável (veja Tabela 11 para composição)

15 Lavagem 2 - Tris a 50 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,5 (5 volumes de coluna)

Eluição - Glicina a 50 mM, NaCl a 10 mM, pH de 3,0 (3 volumes de coluna)

20 Regeneração - NaOH a 50 mM, Na₂SO₄ a 0,5 M (5 volumes de coluna)

Armazenamento - Etanol a 16%, Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH de 5,0 (5 volumes de coluna)

Temperatura de operação: 18-24°C

25 A coluna de proteína A MabSelect foi equilibrada com 5 volumes de coluna de Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A coluna foi carregada a aproximadamente 40 mg de produto/mL de resina. A carga restante foi lavada da coluna com 5 volumes de coluna de Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A coluna foi, então, lavada com uma das soluções descritas na Tabela 11. Antes de eluição, a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de

Tris a 50 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,5. O produto foi eluído da coluna de Proteína A MabSelect com Glicina a 50 mM, NaCl a 10 mM, pH de 3,0. O reservatório de produto foi, então, neutralizado para um pH de 8,0 com Tris a 2M, pH de 9,0. A coluna foi extraída com 5 volumes de coluna de NaOH a 50 mM, Na₂SO₄ a 0,5 M, então, armazenada com 5 volumes de coluna de etanol a 16%, Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. Os resultados são mostrados na Tabela 11 (remoção de HCP) e Tabela 12 (remoção de IRT).

Tabela 11: Remoção de HCP com várias soluções de lavagem

Operação #	Condição de lavagem #1	HCP (PPM)
1	Tris a 50 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5	17.600
2	Acetato de sódio a 50 mM, MnCl ₂ a 1,5 M, pH de 5,0*	10.600
3	Acetato de sódio a 50 mM, NiCl ₂ a 1,5 M, pH de 5,0*	4.700
4	Tris a 50 mM, CaCl ₂ a 2,0 M, pH de 7,5	6.500

*pH de 5,0 foi escolhido em virtude da solubilidade de MnCl₂ e NiCl₂

Tabela 12: Remoção de IRT com várias soluções de lavagem

Operação #	Condição de lavagem #1	IRT (%)
1	Tris a 50 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 7,5	2,78
2	Acetato de sódio a 50 mM, MnCl ₂ a 1,5 M, pH de 5,0*	0,77
3	Acetato de sódio a 50 mM, NiCl ₂ a 1,5 M, pH de 5,0*	0,47
4	Tris a 50 mM, CaCl ₂ a 2,0 M, pH de 7,5	0,87

A Tabela 11 mostra que o nível de HCPs presentes em operações que foram lavadas com soluções contendo cátions divalentes tinham 1,5-3,5 vezes menos HCPs do que o controle (Lavagem com NaCl a 1,0 M). A Tabela 12 mostra que as operações que continham as lavagens com soluções de sais catiônicos divalentes também proporcionam remoção de IRT > 3,5 vezes comparado com a operação com uma solução de lavagem contendo NaCl a 1,0 M. Assim, esses resultados demonstraram que lavagens de sal com outros cátions divalentes (por exemplo, com MnCl₂ ou NiCl₂) diferentes do CaCl₂, também eram eficazes na remoção de impurezas.

Equivalentes

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão ou serão capazes de determinar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descrita aqui. Tais equivalentes se destinam a serem abrangidos pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificação de uma proteína tendo uma região Fc de um líquido fonte compreendendo a proteína e uma ou mais impurezas, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- 5 adsorção da proteína a um agente de ligação Fc;
lavagem do agente de ligação Fc com uma solução tampão contendo um sal catiônico divalente para remover uma ou mais impurezas; e recuperação da proteína do agente de ligação Fc em uma solução de eluição.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de as referidas uma ou mais impurezas serem selecionadas do grupo consistindo de: espécies variantes de transleitura de íntron (IRT), espécies ligadas sob dissulfeto (UDB) e espécies de baixo peso molecular (LMW).

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de as referidas uma ou mais impurezas serem um IRT.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a proteína ser um anticorpo.

20 5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o anticorpo ser selecionado do grupo consistindo de: uma fusão de anticorpo, um anticorpo de murino, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, e um anticorpo humano.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o anticorpo ser um anticorpo anti-IL-13.

25 7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o anticorpo se ligar a um antígeno selecionado do grupo consistindo de: CD3, CD52, VEGF, EGFR, CD33, CD20, HER-2, TNF α , CD25, RSV, IgE, gp IIb/IIIa, CD11a e integrina α 4.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a proteína tendo uma região Fc ser recombinantemente produzida.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de a proteína tendo uma região Fc ser recombinantemente produzida em uma célula de Ovário de Hâmsster Chinês (CHO).

5 10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente de ligação Fc compreender um ou mais de Proteína A e proteína G.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente de ligação Fc ser imobilizado sobre uma fase sólida.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de a fase sólida compreender um ou mais de um glóbulo, um gel, uma resina e uma partícula.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sal catiônico divalente compreender um sal caotrópico.

15 14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sal catiônico divalente ser selecionado do grupo consistindo de: CaCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 e misturas dos mesmos.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão contendo o sal catiônico divalente ter um valor de pH em uma faixa entre cerca de 4 a cerca de 8.

20 16. método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão contendo o sal catiônico divalente ter um valor de pH em uma faixa entre cerca de 4,5 a cerca de 7,5.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão ter uma concentração de sal catiônico divalente em uma faixa entre cerca de 0,1 M a cerca de 5 M.

25 18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de a solução tampão ter uma concentração de sal catiônico divalente em uma faixa entre cerca de 0,5 M a cerca de 3 M.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão contendo um sal catiônico divalente

compreender CaCl_2 a pelo menos cerca de 0,6 M.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão contendo um sal catiônico divalente compreender MgCl_2 a pelo menos cerca de 2 M.

5 21. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a solução tampão contendo um sal catiônico divalente compreender CaCl_2 a pelo menos cerca de 2 M.

10 22. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de as etapas de adsorção da proteína a um agente de ligação Fc e lavagem do agente de ligação Fc serem realizadas em uma temperatura em uma faixa entre cerca de 2°C a cerca de 24°C.

15 23. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem um ou mais de uma proteína da célula hospedeira, um DNA da célula hospedeira, uma proteína de cultura de célula e misturas dos mesmos.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem uma espécie indesejada da proteína tendo uma região Fc.

20 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a espécie indesejada da proteína tendo uma região Fc compreender um ou mais de cadeias de anticorpo ou fragmentos das mesmas tendo seqüência de transleitura intrônica, uma ou mais cadeias de anticorpo ou fragmentos das mesmas tendo uma ligação sob dissulfeto, um meio-anticorpo ou fragmento do mesmo, um dímero de cadeia leve ou fragmento
25 do mesmo e um dímero de cadeia pesada ou fragmento do mesmo.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de recuperação da proteína do agente de ligação Fc compreender eluição da proteína usando um tampão de eluição tendo um pH em uma faixa de cerca de 2,0 a cerca de 6,5.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender uma etapa de cromatografia selecionada do grupo consistindo de: cromatografia de troca de ânions, cromatografia de troca de cátions, cromatografia por afinidade de metal imobilizado e cromatografia por interação hidrofóbica (HIC).

28. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender uma etapa de cromatografia selecionada do grupo consistindo de: cromatografia em hidroxiapatita, diálise, cromatografia por afinidade, precipitação de sulfato de amônio, precipitação de etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC) e cromatofocalização.

29. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem uma ou mais variantes de transleitura de íntron da proteína e a solução de eluição contendo a proteína ter um nível de variantes de transleitura de íntron que é pelo menos 5 vezes menos do que o nível de variantes de transleitura de íntron no líquido fonte.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de uma solução contendo a proteína recuperada na solução de eluição ter um nível de variantes de transleitura de íntron que é pelo menos 10 vezes menor do que o nível de variantes de transleitura de íntron no líquido fonte.

31. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem uma ou mais variantes de transleitura de íntron da proteína e as variantes de transleitura de íntron compreenderem pelo menos cerca de 1% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de as variantes de transleitura de íntron compreenderem menos de cerca de 0,8% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de as variantes de transleitura de íntron compreenderem menos de 0,5% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

5 34. método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de as variantes de transleitura de íntron compreenderem menos de 0,2% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

10 35. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem uma ou mais espécies de baixo peso molecular da proteína e as espécies de baixo peso molecular compreenderem menos de cerca de 1% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de as espécies de baixo peso molecular compreenderem menos de cerca de 0,8% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

15 37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de as espécies de baixo peso molecular compreenderem menos de cerca de 0,5% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

20 38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de as espécies de baixo peso molecular compreenderem menos de cerca de 0,2% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

25 39. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a uma ou mais impurezas compreenderem uma ou mais variantes ligadas sob dissulfeto da proteína e as variantes ligadas sob dissulfeto compreenderem menos de cerca de 15% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de as variantes ligadas sob dissulfeto compreenderem menos de cerca de 10% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado

pelo fato de as variantes ligadas sob dissulfeto compreenderem menos de cerca de 5% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de as variantes ligadas sob dissulfeto compreenderem menos de
5 cerca de 2% de uma espécie da referida proteína na solução de eluição.

43. Proteína, caracterizada pelo fato de ser purificada de acordo com método como definido na reivindicação 1.

44. Proteína de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de a proteína ser um anticorpo.

10 45. Kit compreendendo reagentes para purificação de uma proteína tendo uma região Fc de impurezas, caracterizado pelo fato de compreender um reagente selecionado do grupo consistindo de: um sal catiônico divalente e um agente de ligação Fc e instruções para uso.

RESUMO**“MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA, PROTEÍNA, E, KIT”**

O presente pedido proporciona métodos de purificação de polipeptídeos tendo uma região Fc, por exemplo, anticorpos ou fusões de anticorpo, através de adsorção dos polipeptídeos a um agente de ligação Fc tal como, por exemplo, Proteína A ou Proteína G, seguido por uma lavagem com um tampão de sal catiônico divalente para remover impurezas e subsequente recuperação dos polipeptídeos adsorvidos. O presente pedido também se caracteriza por métodos de eluição do polipeptídeo purificado, bem como à incorporação dos métodos dentro de uma série de purificação. Kits compreendendo componentes para realizados dos métodos e instruções para uso também são proporcionados.