



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 978 309**

⑮ Int. Cl.:

B01D 15/20 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 19198005 (1)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3680000**

⑮ Título: **Métodos para purificar anticuerpos**

⑯ Prioridad:

15.03.2013 US 201361787309 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2024

⑮ Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENTLIMITED (100.0%)
GSK Medicines Research Centre Gunnels Wood Road Stevenage SG1 2NY, GB**

⑯ Inventor/es:

**GOKLEN, KENT E.;
SUDA, ERIC J. y
UBIERA, ANTONIO RAUL**

⑯ Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 978 309 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para purificar anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la purificación de proteínas utilizando un superantígeno tal como la proteína A, la proteína G, o la proteína L inmovilizada a un soporte sólido. En particular, la invención se refiere a componentes de tampón de lavado y al método de uso de los tampones de lavado para eliminar contaminantes de la 10 célula hospedadora durante las etapas de lavado, minimizando la pérdida del producto proteico deseado.

Antecedentes de la invención

15 A lo largo de la última década, la cromatografía de afinidad con proteína A se ha establecido como el principal método de elección para la captura de anticuerpos monoclonales (mAb) de corrientes de alimentación de cultivos de células de mamíferos. Esta etapa de afinidad altamente específica es capaz de eliminar el 98 % de las impurezas en una sola etapa debido a la unión específica entre el ligando de la proteína A y la región Fc del anticuerpo. En condiciones operativas típicas en cromatografía con proteína A, se aplican corrientes de alimentación de cultivo celular clarificado a la columna hasta que se alcanza una determinada masa de carga de anticuerpo. A continuación, la columna 20 generalmente se lava con un tampón de alta fuerza iónica para eliminar los contaminantes de las células hospedadoras unidos a la resina a través de interacciones no específicas. A continuación, el anticuerpo normalmente eluye de la columna mediante un cambio de pH y se recoge para su posterior procesamiento. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es investigar el uso de detergentes combinados con sales para interrumpir las interacciones iónicas e hidrófobas y mejorar la eliminación de contaminantes de las células hospedadoras, reduciendo de este modo la carga 25 de purificación en las operaciones unitarias posteriores.

Para la purificación a gran escala, se pone mucho esfuerzo en optimizar los componentes de los tampones de lavado y elución para maximizar el rendimiento del producto. Sin embargo, en una situación de producción en la que se purifican muchos productos proteicos diferentes al mismo tiempo, desarrollar un tampón de lavado único para cada 30 producto proteico individual requiere mucho tiempo y recursos para examinar varios componentes del tampón y determinar un tampón de lavado apropiado para cada producto proteico en particular. Sería útil y deseable un tampón de lavado intermedio "genérico" que pudiera usarse eficazmente con diferentes tipos de proteínas. La presente invención proporciona un método de purificación de proteínas utilizando dichos componentes de tampón de lavado.

35 "Evaluación del formato de 96 pocillos para la selección de condiciones de tampón cromatográfico", es una tesis de máster de Elin Monie del año 2006 y divulga la selección de 96 tampones de lavado por su capacidad para eliminar HCP de un lisado de células CHO. Algunos de los tampones de lavado probados comprenden ácido caprílico 25 mM.

Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a un método para purificar una proteína, a partir de una solución que contiene al menos un contaminante mediante cromatografía de superantígeno que comprende: a) adsorber la proteína al superantígeno inmovilizado sobre un soporte sólido; b) eliminar el al menos un contaminante poniendo en contacto el superantígeno inmovilizado que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende caprilato de sodio aproximadamente 100 mM; y c) eluir la proteína del superantígeno inmovilizado sobre el soporte sólido, en donde el superantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteína A, proteína G y proteína L, en donde el al menos un contaminante es una proteína de la célula hospedadora o ADN de la célula hospedadora, en donde aproximadamente significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0,1\%$, y en donde la proteína se selecciona del grupo 45 que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable de inmunoglobulina único, Fab, F(ab')2, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, scFv unido a disulfuro y diacuerpo.

Breve descripción de los dibujos

55 Figura 1. Resultados del estudio de concentración de caprilato: anti-OSM.
 Figura 2. Resultados del estudio de concentración de caprilato: anti-IL13.
 Figura 3. Resultados del estudio de comparación de ácidos carboxílicos.

Descripción detallada de la divulgación

60 Ha de comprenderse que la presente divulgación no se limita a los métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante. Como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural salvo que el contenido indique claramente lo contrario.

Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye una combinación de dos o más polipéptidos, y similares.

5 "Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $un \pm 20\%$ o $\pm 10\%$, incluyendo el $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ y $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos desvelados.

10 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la divulgación. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o ensayo para la presente divulgación, en el presente documento se describen los materiales y métodos preferidos. En la descripción y las reivindicaciones de la presente divulgación, se utilizará la siguiente terminología.

15 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Un polipéptido puede ser de origen natural (derivado de tejido), de expresión recombinante o natural a partir de preparaciones celulares procariotas o eucariotas, o producirse químicamente a través de métodos sintéticos. Las expresiones se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de 20 aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes; a continuación se describen algunas composiciones no naturales ilustrativas útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y pautas. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se 25 pueden generar reemplazando con, p. ej., D- o L-naftilanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tienilanalanina; D- o L-1, -2,3- o 4-pirenilanina; D- o L-3-tienilanalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y, D- o L-30 alquilaminas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, isopentilo sustituido o no sustituido, o un aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, p. ej., tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, anillos aromáticos de pirrolilo y piridilo.

35 "Péptido", como se usa en el presente documento, incluye péptidos que son variaciones conservadoras de los péptidos ejemplificados específicamente en el presente documento. "Variación conservadora", como se usa en el presente documento, indica la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o 40 glutamina por asparagina, y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden sustituirse entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. "Variación conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreaccionen con el polipéptido no sustituido. Dichas sustituciones conservadoras están dentro de la definición de las clases de los péptidos de la divulgación. "Catiónico", como se usa en el presente documento, se 45 refiere a cualquier péptido que posea una carga neta positiva a pH 7,4. La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento.

50 "Recombinante", cuando se usa con referencia a una proteína, indica que la proteína se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o una proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína naturales.

Como se usa en el presente documento, una "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína y/o polipéptido que se puede administrar a un mamífero para provocar una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca, por ejemplo, por un investigador o médico. Una proteína terapéutica puede provocar más 55 de una respuesta biológica o médica. Asimismo, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado, pero no se limita a, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal así como cantidades eficaces para provocar una función fisiológica en un paciente que potencia o ayuda al efecto terapéutico de un segundo agente farmacéutico.

60 Todos los restos de "aminoácidos" identificados en el presente documento están en la configuración L natural. Según la nomenclatura de polipéptidos convencional, las abreviaturas para los restos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

1 letra	3 letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
(continuación)		
1 letra	3 letras	Aminoácido
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gin	L-glutamina
E	Glu	L-ácido glutámico
w	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

- 5 Cabe señalar que todas las secuencias de restos de aminoácidos están representadas en el presente documento por fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo.
- 10 En otra realización, el polipéptido es un polipéptido de unión a antígeno. En una realización, el polipéptido de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un receptor soluble, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable de inmunoglobulina único, Fab, F(ab')2, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido a disulfuro o diacuerpo.
- 15 La expresión "polipéptido de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras construcciones de proteínas que son capaces de unirse a un antígeno.
- 20 Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o F(ab')2 se usan con sus significados convencionales (véase, p. ej., Harlow *et al.*, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).
- 25 Un "anticuerpo químérico" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadenas pesadas) procedente de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada procedente de un anticuerpo aceptor.
- 30 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería que tiene sus CDR procedentes de una inmunoglobulina no humana donante, siendo las restantes partes procedentes de la inmunoglobulina de la molécula procedentes de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, los restos de soporte del marco pueden alterarse para conservar la afinidad de unión (véanse, p. ej., Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson *et al.*, Bio/Technology, 9:421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, p. ej., la base de datos KABAT.RTM., base de datos Los Alamos y base de datos Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones marco del anticuerpo donante (basándose en los aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones marco variables o constantes de cadena ligera puede seleccionarse de manera similar. Cabe señalar que no es necesario que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor se originen a partir del mismo anticuerpo aceptor. El estado de la técnica describe varias formas de producir dichos anticuerpos humanizados; véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.
- 35 La expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que aporta las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a un primer compañero de inmunoglobulina, para proporcionar a la región codificante de inmunoglobulina alterada y al anticuerpo

alterado expresado resultante la especificidad antigénica y la actividad neutralizante características del anticuerpo donante.

- 5 La expresión "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donante, que aporta todas (o cualquier porción, pero en algunas realizaciones la totalidad) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina asociado. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.
- 10 Las "CDR" se definen como secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina. Véase, p. ej., Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4^a ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las 15 tres CDR de cadena pesada, o las tres CDR de cadena ligera (o todas las CDR de cadena pesada y todas las de cadena ligera, si corresponde). La estructura y el plegamiento de la proteína del anticuerpo puede hacer que otros restos se consideren parte de la región de unión al antígeno y así lo debe entender un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, págs. 877-883.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales individuales de las proteínas y, en muchos casos, pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único de 25 anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles se han reemplazado por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones amino o carboxiterminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos la actividad de unión 30 y la especificidad del dominio de longitud completa.
- 35 La expresión "dominio variable de inmunoglobulina único" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítopo independientemente de una región o dominio V diferente. Un dominio variable de inmunoglobulina único puede estar presente en un formato (por ejemplo, homomultímero o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables diferentes donde las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión al antígeno mediante el dominio variable de inmunoglobulina único (es decir, donde el dominio variable de inmunoglobulina único se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable de inmunoglobulina único" que es capaz de unirse a un antígeno como se usa el término en el presente documento. Un dominio variable de 40 inmunoglobulina único puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo únicos de otras especies tales como roedores (por ejemplo, como se divulga en el documento WO 00/29004), dAb V_H de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina único que proceden de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Dichos dominios V_{HH} 45 pueden humanizarse según técnicas convencionales disponibles en la técnica y dichos dominios se consideran "anticuerpos de dominio" según la divulgación. Como se usa en el presente documento, " V_H " incluye dominios V_{HH} de camélidos. Los NARV son otro tipo de dominio variable de inmunoglobulina único que se identificaron en peces cartilaginosos, incluido el tiburón nodriza. Estos dominios también se conocen como región variable de receptor de antígeno nuevo (comúnmente abreviada como V(NAR) o NARV). Para detalles adicionales, véase Mol. Immunol. 44, 50 656-665 (2006) y el documento US20050043519A.

- 55 La expresión "dominio de unión a epítopo" se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno o epítopo independientemente de una región o dominio V diferente, esto puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina único, humano, de camélido o de tiburón.
- 60 Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión a antígeno" se refiere a un sitio en una proteína que es capaz de unirse específicamente al antígeno, este puede ser un dominio único, por ejemplo, un dominio de unión a epítopo, o puede ser dominios V_H/V_L emparejados que se pueden encontrar en un anticuerpo convencional. En algunos aspectos de la divulgación, los dominios Fv monocatenarios (ScFv) pueden proporcionar sitios de unión a antígeno.

Los términos "mAbdAb" y "dAbmAb" se utilizan en el presente documento para referirse a las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación. Los dos términos se pueden usar indistintamente y se pretende que tengan el mismo significado que se usa en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para purificar una proteína que comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o dominio variable de inmunoglobulina único, a partir de una solución que contiene al menos un contaminante mediante cromatografía de superantígeno que comprende: a) adsorber la proteína al superantígeno inmovilizado sobre un soporte sólido; b) eliminar al menos un contaminante poniendo en contacto el superantígeno inmovilizado que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende un carboxilato alifático; y c) eluir la proteína del superantígeno inmovilizado sobre el soporte sólido.

5 En una realización, la cromatografía de afinidad se realiza usando un superantígeno. "Superantígeno" se refiere a ligandos genéricos que interactúan con miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas en un sitio que es distinto 10 de los sitios de unión al ligando diana de estas proteínas. Las enterotoxinas estafilococicas son ejemplos de superantígenos que interactúan con los receptores de linfocitos T. Los superantígenos que se unen a los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteína G, que se une a la región constante de IgG (Bjorck y Kronvall, J. Immunol., 133:969 (1984)); Protein A which binds the IgG constant region and V_H domains (Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97:822 (1966)); y Proteína L que se une a dominios V_I (Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)). En una realización, el 15 superantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteína A, proteína G y proteína L.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "proteína A" abarca la proteína A recuperada de una fuente 20 nativa de la misma, la proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y variantes de la misma que conservan la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región C_{H2}/C_{H3}. La proteína A se puede adquirir comercialmente en Repligen, Pharmacia y Fermatech.

Como se usa en el presente documento, la "cromatografía de afinidad" es un método cromatográfico que utiliza 25 interacciones reversibles específicas entre biomoléculas en lugar de propiedades generales de la biomolécula tal como el punto isoeléctrico, la hidrofobicidad o el tamaño, para efectuar la separación cromatográfica. "Cromatografía de afinidad con proteína A" o "cromatografía con proteína A" se refiere a un método cromatográfico de afinidad específica que hace uso de la afinidad de los dominios de unión de IgG de la proteína A por la porción Fc de una molécula de 30 inmunoglobulina. Esta porción Fc comprende dominios constantes C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina humana o animal o dominios de inmunoglobulina sustancialmente similares a estos. La proteína A abarca la proteína nativa de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, la proteína A producida mediante métodos recombinantes o sintéticos y variantes 35 que conservan la capacidad de unirse a una región Fc. En la práctica, la cromatografía con proteína A implica el uso de proteína A inmovilizada en un soporte sólido. Véase Gagnon, Protein A Affinity Chromotography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, págs. 155-198, Validated Biosystems, 1996. También se pueden utilizar la proteína G y la 40 proteína L para cromatografía de afinidad. El soporte sólido es una matriz no acuosa sobre la que se adhiere la proteína A (por ejemplo, una columna, resina, matriz, perla, gel, etc.). Dichos soportes incluyen agarosa, sefarosa, vidrio, sílice, poliestireno, carbón de colodión, arena, polimetacrilato, poli(estireno-divinilbenceno) reticulado y agarosa con extensor de superficie de dextrano y cualquier otro material adecuado. Dichos materiales son bien conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier método adecuado para fijar el superantígeno al soporte sólido. Los métodos para fijar 45 proteínas a soportes sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Ostrove, en Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990. Dichos soportes sólidos, con y sin proteína A o proteína L inmovilizadas, están fácilmente disponibles en muchas fuentes comerciales, incluidas Vector Laboratory (Burlingame, California), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), BioRad (Hércules, California), Amersham Biosciences (parte de GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y Millipore (Billerica, Mass.).

50 El carboxilato alifático puede ser de cadena lineal o ramificada. En determinadas realizaciones, el carboxilato alifático es un ácido carboxílico alifático o una sal del mismo, o la fuente del carboxilato alifático es un ácido carboxílico alifático o una sal del mismo. En determinadas realizaciones, el carboxilato alifático es de cadena lineal y se selecciona del grupo que consiste en ácido metanoico (fórmico), ácido etanoico (acético), ácido propanoico (propiónico), ácido butanoico (butírico), ácido pentanoico (valérico), ácido hexanoico (caproico), ácido heptanoico (enántico), ácido octanoico (caprílico), ácido nonanoico (pelargónico), ácido decanoico (cáprico), ácido undecanoico (undecílico), ácido dodecanoico (láurico), ácido tridecanoico (tridecílico), ácido tetradecanoico (mirístico), ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico (palmítico), ácido heptadecanoico (margárico), ácido octadecanoico (esteárico) y ácido icosanoico (araquidílico) o cualquiera de sus sales. En consecuencia, el carboxilato alifático puede comprender una cadena principal de carbonos de 1 a 20 carbonos de longitud. En una realización, el carboxilato alifático comprende una cadena principal de 6 a 12 carbonos. En una realización, el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste 55 en caproato, heptanoato, caprilato, decanoato y dodecanoato. En una realización, la fuente del carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en un ácido carboxílico alifático, una sal de sodio de un ácido carboxílico alifático y una sal de potasio de un ácido carboxílico alifático. En una realización, el tampón de lavado comprende caprilato de sodio, decanoato de sodio o dodecanoato de sodio. En una realización, el tampón de lavado comprende caprilato de sodio aproximadamente 10 mM a aproximadamente 125 mM, decanoato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM, o dodecanoato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM. En una realización, el tampón de lavado comprende caprilato de sodio aproximadamente 100 mM, decanoato de sodio aproximadamente 20 mM, o dodecanoato de sodio aproximadamente 20 mM. En una realización, el tampón de lavado comprende acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. En una realización, el tampón de lavado comprende acetato de sodio aproximadamente 300 mM.

En una realización, al menos un contaminante es una proteína de la célula hospedadora o ADN de la célula hospedadora. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en células CHO seleccionadas del grupo que consiste en, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K562, células BHK, células PER.C6 y células HEK.

- 5 Un "tampón" es una solución tamponada que resiste los cambios de pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base.
- 10 Un "tampón de equilibrio" en el presente documento es el utilizado para preparar la fase sólida para cromatografía.
- 15 El "tampón de carga" es el que se utiliza para cargar la mezcla de la proteína y contaminante(s) en la matriz de cromatografía. Los tampones de equilibrio y carga pueden ser los mismos.
- 20 El "tampón de elución" se utiliza para eluir proteínas de la matriz de cromatografía.
- 25 Una "sal" es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base.
- 30 En una realización, el tampón de lavado comprende un ácido orgánico, una sal de metal alcalino o de amonio de la base conjugada del ácido orgánico, y una base orgánica. En una realización, el tampón de lavado se elabora sin la adición de NaCl.
- 35 En una realización, el ácido orgánico incluye, pero no se limita a, ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, glicina, ácido fosfórico, glicilglicina, ácido succínico, TES (ácido 2-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}etanosulfónico}, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-ethanosulfónico) y MES (ácido 2-(N-morfolino)ethanosulfónico).
- 40 En una realización, la base orgánica incluye, pero no se limita a, el grupo formado por la base tris, arginina, Bis-tris, Bis-tris propano, Bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico), TAPS (ácido 3-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}propanosulfónico) y Tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina).
- 45 En una realización, la base conjugada del ácido orgánico es la sal de sodio, potasio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico. En una realización, el ácido orgánico es el ácido acético y la base conjugada del ácido acético es la sal de sodio.
- 50 En una realización, la proteína es una proteína de unión a antígeno. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo es de la clase IgG. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un dominio variable de inmunoglobulina única.
- 55 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para purificar una proteína a partir de una solución contaminada de la misma mediante cromatografía con proteína A que comprende:
- (a) equilibrar una proteína A inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de proteína A;
- (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la proteína A inmovilizada en la fase sólida;
- 45 (c) eliminar al menos un contaminante lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de proteína A que comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a aproximadamente pH 7,5, en donde el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio aproximadamente 100 mM, decanoato de sodio aproximadamente 20 mM y dodecanoato de sodio aproximadamente 20 mM; y
- 50 (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de proteína A. En una realización, todos los tampones se elaboran sin la adición de NaCl. En una realización, el tampón de lavado de proteína A comprende además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. En una realización, el tampón de lavado de proteína A comprende acetato de sodio aproximadamente 300 mM.
- 55 En una realización, el tampón de equilibrio comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, a aproximadamente pH 7,2; y el tampón de elución comprende acetato de sodio 1,8 mM y ácido acético aproximadamente 28,2 mM a aproximadamente 300 mM, a aproximadamente pH 2,4 a aproximadamente pH 3,6.
- 60 En una realización, el método comprende además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes lavando la fase sólida con un segundo tampón de lavado de proteína A que comprende base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,2. En una realización, el segundo tampón de lavado de proteína A se elabora sin la adición de NaCl.
- En una realización, el método comprende además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) valorar la solución

que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con tris 1 M.

5 En una realización, el método comprende además filtrar la solución producida en la etapa (g).

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para purificar una proteína a partir de una solución 10 contaminada de la misma mediante cromatografía con proteína L que comprende:

- 10 (a) equilibrar una proteína L inmovilizada en una fase sólida con un tampón de equilibrio de proteína L;
- (b) adsorber la proteína de la solución contaminada a la proteína L inmovilizada en la fase sólida;
- (c) eliminar al menos un contaminante lavando la fase sólida con un primer tampón de lavado de proteína L que comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, al menos un carboxilato alifático, a aproximadamente pH 7,5, en donde el carboxilato alifático se selecciona del grupo que consiste en caprilato de sodio aproximadamente 100 mM, decanoato de sodio aproximadamente 20 mM y dodecanoato de sodio aproximadamente 20 mM; y
- (d) recuperar la proteína de la fase sólida con un tampón de elución de proteína L. En una realización, todos los tampones se elaboran sin la adición de NaCl. En una realización, el tampón de lavado de proteína L comprende además acetato de sodio aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. En una realización, el tampón de lavado de proteína L comprende aproximadamente acetato de sodio 300 mM.

En una realización, el tampón de equilibrio comprende base tris aproximadamente 50 mM a aproximadamente 55 mM, ácido acético aproximadamente 45 mM a aproximadamente 50 mM, a aproximadamente pH 7,2; y el tampón de elución comprende acetato de sodio 1,8 mM y ácido acético aproximadamente 28,2 mM a aproximadamente 300 mM, a aproximadamente pH 2,4 a aproximadamente pH 3,6.

En una realización, el método comprende además la siguiente etapa después de la etapa (c) y antes de la etapa (d): eliminar los contaminantes lavando la fase sólida con un segundo tampón de lavado de proteína L que comprende base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, a aproximadamente pH 7,2. En una realización, el segundo tampón de lavado de proteína L se elabora sin la adición de NaCl.

En una realización, el método comprende además las siguientes etapas después de la etapa (d): (e) valorar la solución que contiene la proteína recuperada a aproximadamente pH 3,0 con ácido acético 30 mM, HCl 100 mM; (f) permitir que la solución de la etapa (e) permanezca a aproximadamente pH 3,0 durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; y (g) ajustar el pH de la solución de la etapa (f) a aproximadamente pH 7,5 con tris 1 M.

En una realización, el método comprende además filtrar la solución producida en la etapa (g).

40 La "solución" puede ser un medio de cultivo celular, por ejemplo, una corriente de alimentación de cultivo celular. La corriente de alimentación puede filtrarse. La solución puede ser un caldo clarificado sin procesar (CUB) (o caldo/sobrenadante de fermentación clarificado). El CUB también se conoce como sobrenadante de cultivo celular y las células y/o restos celulares se eliminan mediante clarificación. Como alternativa, se recoge al menos un extracto periplásmico usando métodos conocidos en la técnica. La solución puede ser una preparación lisada de células que expresan la proteína (por ejemplo, la solución es un lisado).

50 "Contaminante" se refiere a cualquier molécula extraña o indeseable que esté presente en la muestra de carga antes de la cromatografía de superantígeno o después de la cromatografía de superantígeno en el eluato. Puede haber "impurezas del proceso" presentes. Son impurezas que están presentes como resultado del proceso en el que se produce la proteína de interés. Por ejemplo, estas incluyen proteínas de la célula hospedadora (HCP), ARN y ADN (por ejemplo, virus). "HCP" se refiere a proteínas, no relacionadas con la proteína de interés, producidas por la célula hospedadora durante el cultivo celular o la fermentación, incluyendo proteínas intracelulares y/o secretadas. Un ejemplo de una proteína de la célula hospedadora es una proteasa, lo que puede causar daño a la proteína de interés 55 si todavía está presente durante y después de la purificación. Por ejemplo, si permanece una proteasa en la muestra que comprende la proteína de interés, puede crear sustancias o impurezas relacionadas con el producto que no estaban presentes originalmente. La presencia de proteasas puede provocar la degradación de la proteína de interés con el tiempo durante el proceso de purificación y/o en la formulación final. Eliminación de HCP, o niveles reducidos de HCP, por definición equivale a la eliminación o reducción de proteasas.

60 Las impurezas del proceso también incluyen componentes utilizados para hacer crecer las células o para asegurar la expresión de la proteína de interés por ejemplo, disolventes (por ejemplo, metanol utilizado para cultivar células de levadura), antibióticos, metotrexato (MTX), componentes de los medios, floculantes, etc. También se incluyen moléculas que forman parte de la fase sólida del superantígeno que se filtran en la muestra durante las etapas

anteriores, por ejemplo, proteína A, proteína G o proteína L.

Los contaminantes también incluyen "sustancias relacionadas con el producto", que incluyen proteínas que conservan su actividad pero que tienen una estructura diferente; e "impurezas relacionadas con el producto", que incluyen proteínas que han perdido su actividad debido a su diferencia en estructura. Estas variantes relacionadas con el producto incluyen, por ejemplo, especies de alto peso molecular (HMW), especies de bajo peso molecular (LMW), proteínas agregadas, precursores, proteínas degradadas, proteínas mal plegadas, proteínas con enlaces subdisulfuro, fragmentos y especies desamidas.

5 La presencia de cualquiera de estas impurezas en el eluato se puede medir para establecer si la etapa de lavado ha
10 sido exitosa. Por ejemplo, hemos mostrado una reducción en el nivel de HCP detectado medido en ng de HCP por mg de proteína (véanse los Ejemplos).

15 En consecuencia, el eluato del soporte sólido de superantígeno puede contener la proteína en una muestra con HCP o ADN presente en aproximadamente 5000 partes por millón (ppm) o menos, 4000 partes por millón (ppm) o menos, 3000 partes por millón (ppm) o menos, 2500 partes por millón (ppm) o menos, 2000 partes por millón (ppm) o menos, 1500 partes por millón (ppm) o menos, 1000 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 900 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 800 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 700 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 600 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 500 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 400 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 300 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 200 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 100 partes por millón (ppm) o menos, aproximadamente 90 ppm o menos, aproximadamente 80 ppm o menos, aproximadamente 70 ppm o menos, aproximadamente 60 ppm o menos, o aproximadamente 50 ppm o menos. "Ppm" equivale a ng/mg y "ppb" ("partes por mil millones") equivale a pg/mg.

20 25 Puede mostrarse una reducción en comparación con una etapa de lavado de control sin carboxilato alifático. Como alternativa, la reducción puede mostrarse en comparación con una etapa de lavado de control sin carboxilato alifático ni acetato de sodio.

30 35 Se describe un método, en donde la recuperación de la proteína de interés del eluato es del 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % o menos, incluyendo cualquier valor discreto dentro del intervalo del 100 % al 50 % o cualquier subintervalo definido por cualquier par de valores discretos dentro de este intervalo, después de la etapa de lavado de la divulgación. El porcentaje (%) de recuperación en el eluato se calcula determinando la cantidad de proteína de interés en el eluato como porcentaje de la cantidad de proteína de interés aplicada a la columna de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{Cantidad de producto en el eluato}}{\text{Cantidad de producto en la carga}} \times 100$$

Cantidad de producto en la carga

40 La cantidad de contaminante presente en el eluato puede determinarse mediante ELISA, OCTET, u otros métodos para determinar el nivel de uno o más de los contaminantes descritos anteriormente. En los ejemplos descritos en el presente documento, se utiliza un método ELISA para determinar el nivel de HCP en una muestra.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

45 50 Todos los procesos cromatográficos se llevaron a cabo utilizando un sistema AKTA Explorer 100 de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La concentración de muestras de proteína pura se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un Thermo Scientific NanoDrop 1000 (RN). Las concentraciones de proteína de las muestras en bruto se determinaron utilizando una columna POROS Protein A (2,1 x 30 mm) obtenida de Applied Biosystems (Foster City, CA) en un HPLC Agilent 1100 de Hewlett Packard (Palo Alto, CA). El medio MabSelect SuRe Protein A se obtuvo de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Las columnas Vantage se obtuvieron de Millipore Corporation (Bedford, MA). Las mediciones de turbidez se tomaron utilizando un turbidímetro 2100P con celdas de muestra de vidrio, n.º catálogo 24347-06 obtenido de HACH Company (Loveland, CO, EE.UU.). Todos los productos químicos se obtuvieron de JT Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey) o Sigma Aldrich (St Louis, MO) y eran de calidad USP.

55 Todos los experimentos de cromatografía se llevaron a cabo con una columna MabSelect SuRe de 1,1 x 25 cm en un sistema de cromatografía AKTA Explorer 100, salvo que se indique lo contrario. La concentración de anticuerpos del filtrado del cultivo celular se determinó mediante la proteína A analítica o se llevó a cabo mediante el ensayo de concentración de proteína Biacore realizado por el grupo de Bioanalytical Sciences de GSK Upper Merion.

60 Ejemplo 2 - Detección inicial de aditivos de tampón de lavado

Los tampones se prepararon valorando a pH específicos utilizando ácido acético o base tris. Como control, se compararon las condiciones de selección con los resultados de un tampón de lavado similar a un tampón de lavado estándar con alto contenido de sal y proteína A, Tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2. Véase la Figura 1 para

obtener una lista completa de las cinco condiciones experimentales probadas y las Tablas 3 y 4 para los resultados correspondientes. Los tampones de lavado se probaron en cromatografía con proteína A de filtrado del cultivo celular anti-OSM (GSK315234) y anti-IL13 (GSK679586) de GSK. Estos dos casos separados dieron como resultado tendencias similares de reducción de HCP y ADN.

5 Los niveles de impureza en los productos de proteína A para los tampones de lavado Triton X100 y Triton X114 no se evaluaron más a fondo debido a un perfil de elución alterado y atípico y a una pérdida excesiva de producto. El tampón que contiene PS80, un tensioactivo no iónico a base de polímero de óxido de etileno, mostró una eliminación marginal en comparación con el tampón de lavado estándar de NaCl 1 M. La mayor reducción de HCP y ADN provino del tampón de lavado que contenía caprilato de sodio 100 mM, una sal sódica del ácido carboxílico, ácido octanoico. El tampón caprilato 100 mM dio como resultado una reducción de las HCP de aproximadamente 5 veces en comparación con el control tanto para anti-OSM como para anti-IL13. Asimismo, dio como resultado una reducción de 100 y 60 veces en el ADN en comparación con el control para anti-IL13 y anti-OSM respectivamente. Véase la Tabla 3 y la Tabla para conocer el rendimiento completo, HCP, datos de ADN y SEC para anti-OSM y anti-IL13 con condiciones de selección de lavado.

10

15 Tabla 2 Resumen experimental de las condiciones de lavado

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equil - tris 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2
35 mg/ml	300	Carga a 300 cm/h
5 CV	400	Lavado 1 - Desarrollo n.º Tris 1 - 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2 Tris 2 - 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1 %, pH 7,2 Tris 3 - 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, Tritón X100 al 1 %, pH 7,2 Tris 4 - 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, Tritón X114 al 1 %, pH 7,2 Tris 5 - 50 mM, ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2
5CV	400	Lavado 2- tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4CV*	300	Almacenamiento - etanol al 20 %, fosfato, 50 mM, pH 7,0

*Solo se realiza en el último ciclo para almacenar la columna

Tabla 3 Resultados experimentales del desarrollo del lavado anti-IL13

Tampón de lavado	Muestra	HCP (ng/mg)	ADN (pg/mg)	% de Monómero	% de Rendimiento	Factor de reducción respecto al control	
						HCP	ADN
	Carga	458282	3219895	---	---		
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2 (control)	Lavado con sal - Mab Select SuRe Material eluido	648	537	96,8%	81,1%	1	1
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2	Lavado con caprilato - Mab Select SuRe Material eluido	140	5	97,0%	79,2%	4,6	107
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1%, pH 7,2	Lavado con PS80 - Mab Select SuRe Material eluido	607	253	96,9%	77,2%	1,1	2,1

20 Tabla 4 Resultados experimentales del desarrollo del lavado anti-OSM

Tampón de lavado	Muestra	HCP (ng/mg)	ADN (pg/mg)	% de Monómero	% de Rendimiento	
					SEC	Biacore
	Carga	242258	13550	---	---	---
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, pH 7,2	Lavado con sal - MabSelect SuRe Material eluido	136	59	99,3 %	95,1 %	
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, caprilato de sodio 100	Lavado con caprilato - MabSelect SuRe	23	1	98,9 %	95,3 %	

mM, pH 7,2	Material eluido					
Tris 50 mM, Ácido acético, NaCl 1 M, PS80 al 1 %, pH 7,2	Lavado con PS80 - MabSelect SuRe Material eluido	135	49	98,8 %	99,3 %	

Ejemplo 3 - Efecto de la concentración de caprilato sobre la eliminación de impurezas

- 5 Para examinar los efectos de la concentración de caprilato de sodio sobre la eliminación de impurezas, se probaron una serie de concentraciones de caprilato de sodio. Véase en la Tabla 5 una lista de tampones y caudales utilizados para examinar los efectos de la concentración del caprilato en la eliminación de impurezas para anti-OSM y anti-IL13. Los datos de los estudios de concentración de caprilato se resumen en la Figura 1 y la Figura 2 para anti-OSM y anti-IL13. Para la cromatografía anti-IL13 y anti-OSM, los cambios en la concentración de caprilato impactan claramente en la reducción de HCP y ADN de CHO. Cuanto mayor era la concentración de caprilato, mayor era la reducción de HCP y ADN tanto para anti-OSM como para anti-IL13. Sin embargo, la mayor reducción de HCP y ADN se observó con una combinación de caprilato de sodio y acetato de sodio 0,3 M. El efecto combinado del detergente y una sal aumentó la capacidad de eliminación del tampón en comparación con un detergente o una sal solos.
- 10 15 La concentración máxima de caprilato de sodio probada en este estudio fue de 100 mM de caprilato de sodio debido a una solubilidad determinada empíricamente de aproximadamente caprilato de sodio 125 mM a un pH de 7,2. Dado que se espera que la solubilidad aumente a un pH más alto, se podrían probar concentraciones más altas de caprilato ajustando el sistema tampón y los componentes, si se requiriera una mayor eliminación de contaminantes de la célula hospedadora. Partiendo de este trabajo, sin embargo, se determinó que el caprilato de sodio 100 mM en combinación con acetato de sodio 0,3 M proporcionó una eliminación adecuada de las impurezas de la célula hospedadora.
- 20

Tabla 5 Diseño experimental del efecto de la concentración de caprilato

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equil - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
35 mg/ml	300	Carga a 300 cm/h
5 CV	400	Lavado 1 - N.º de desarrollo Tris 1 - 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 25 mM, pH 7,2 Tris 2 - 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 50 mM, pH 7,2 Tris 3 - 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 75 mM, pH 7,2 Tris 4 - 50 mM, ácido acético, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2 Tris 5 - 50 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,2
5CV	400	Lavado 2- tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4CV*	300	Almacenamiento - etanol al 20 %, fosfato, 50 mM, pH 7,0

*Solo se realiza en el último ciclo para almacenar la columna

Ejemplo 4 - Selección de ácido carboxílico

- 25 El caprilato de sodio es la sal sódica del ácido caprílico, que consiste en una cadena alifática de ocho carbonos de longitud que pertenece a una clase de ácidos carboxílicos. Estas sales anfipáticas saturadas no ramificadas actúan como detergente debido a sus colas de carbono saturadas y su grupo de cabeza carboxilo cargado. Para determinar el efecto de la longitud de la cola de carbono en la eliminación de contaminantes se probaron diferentes sales de sodio. Estas otras sales analizadas incluyen caproato de sodio, heptanoato de sodio, caprilato de sodio, decanoato de sodio y dodecanoato de sodio. En la Tabla 6 se resume el diseño experimental. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 3. El dodecanoato de sodio se excluyó del análisis debido al bajo rendimiento y al comportamiento de elución alterado observado en los experimentos preliminares. Aunque todas las diferentes sales dieron como resultado rendimientos de producto similares, a excepción del dodecanoato, todos ellos dieron como resultado perfiles de impurezas muy diferentes. A medida que aumentaba el número de carbonos en la cadena, los niveles de impureza disminuían. Las sales de sodio con cadenas de carbono menores que el caprilato de sodio (C8) dieron como resultado niveles de impureza mucho más altos. Los dos mejores candidatos para un aditivo de tampón de lavado son el caprilato de sodio y el decanoato de sodio.
- 30 35

Tabla 6 Diseño experimental: comparación de ácidos carboxílicos

CV	Caudal (cm/h)	Tampón
3,5 CV	400	Equil - tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
35 mg/ml	300	Carga a 300 cm/h

5 CV	400	Lavado 1 - Desarrollo n. ^o Tris 1 - 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, caproato de sodio 100 mM, pH 7,5 Tris 2 - 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, heptanoato de sodio 100 mM, pH 7,5 Tris 3 - 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,5 Tris 4 - 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, decanoato de sodio 20 mM, pH 8,0 Tris 5 - 55 mM, ácido acético, acetato de sodio 0,3 mM, dodecanoato de sodio 20 mM, pH 8,0
5CV	400	Lavado 2- tris 50 mM, ácido acético, pH 7,2
4CV	400	Elución - ácido acético 30 mM, base tris, pH 3,6
3CV	400	Tira - pH 1,5 HCl
3CV	300	Limpieza - NaOH 0,1 N
4CV*	300	Almacenamiento - etanol al 20 %, fosfato, 50 mM, pH 7,0

*Solo se realiza en el último ciclo para almacenar la columna

Ejemplo 5. Efecto del lavado optimizado sobre la turbidez

- 5 También se exploraron los efectos del lavado optimizado con caprilato en las operaciones unitarias posteriores; con especial atención a su impacto para minimizar la precipitación posterior de la proteína A y la mejorar la capacidad de filtración. El filtrado del cultivo celular anti-IL13 a partir del filtrado del cultivo celular anti-IL13 a 1,16 g/l se procesó en una columna MabSelect SuRe de 2,6 x 27 cm utilizando dos regímenes de lavado diferentes. La mitad de este material se procesó mediante cromatografía con proteína A utilizando el régimen de lavado optimizado que incorpora caprilato de sodio. La otra mitad del material se procesó con tampón de equilibrio en lugar del lavado con caprilato. Utilizando 10 la turbidez como determinante de la capacidad de filtración, se registraron mediciones de turbidez de los materiales eluidos. Los eluatos se titularon a continuación a pH 3,5 con ácido acético 30 mM, ácido clorhídrico 100 mM. Las mediciones de turbidez se midieron y registraron nuevamente. Después de una incubación de una hora de las muestras de eluato a pH 3,5, se titularon a pH 6,0 en preparación para la siguiente operación unitaria. Se midieron y registraron mediciones de turbidez de los materiales eluidos con pH ajustado. Los datos resultantes se resumen en la 15 Tabla y el perfil de impurezas se presenta en la Tabla. Considerando la turbidez como indicador de la capacidad de filtración, el lavado con caprilato reduciría parte de la carga de filtración debido a una disminución del 50 % en la turbidez del material de carga de intercambio aniónico.

Tabla 7 Mediciones de turbidez anti-IL13

	Con caprilato	Sin caprilato
Turbidez	NTU	NTU
Material eluido de MabSure	36	79
Material eluido de pH bajo	10	10
Material eluido con pH ajustado 6,0	64	134

20

Tabla 8 Efecto del lavado con caprilato sobre la pureza de los perfiles de impurezas anti-IL13 post-proteína A

	Con caprilato		Sin caprilato	
	HCP	ADN	HCP	ADN
Muestra	ng/mg	pg/mg	ng/mg	pg/mg
Material eluido de MabSure	12	7	244	222
Material eluido de pH bajo	15	7	248	134
Material eluido con pH ajustado 6,0	6	<10	195	<10

Ejemplo 6: Purificación de anticuerpos de dominio utilizando tampón caprilato de proteína A en tampón tris-acetato.

- 25 DOM0100, una molécula dAb de 25 kDa (V_k-V_H albulAb+TNFR1dAb) expresada en *E. coli* se purificó usando MabSelect Xtra con proteína A de GE Healthcare empaquetada en una columna de 0,5 x 20 cm. El caudal fue de 300 cm³/h para todas las etapas. Después del equilibrio con base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, pH 7,5, se cargó filtrado del cultivo celular en la columna a 13,5 mg/ml de resina. El título de carga fue de 1,88 mg/ml. La columna se lavó a continuación usando 5 volúmenes de columna de base tris 55 mM, ácido acético 45 mM, acetato de sodio 300 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7,5. A continuación, se eluyó la proteína y posteriormente se limpió la columna, se desinfectó y se almacenó. El análisis del pico de elución arrojó 1440 ppm de HCP (proteínas de la célula hospedadora) mediante ELISA con un rendimiento del 74,9 %. El mismo experimento repetido dos veces en las mismas condiciones, pero con un lavado con alto contenido de sal en lugar del lavado con caprilato, obtuvo 2398 ppm y 2456 ppm de HCP mediante ELISA para un rendimiento del 77,2 % y 76,0 % respectivamente. El efecto de la secuencia cromatográfica 30

evaluada en una columna de 0,5 cm x 10 cm que coincidía con el tiempo de residencia no tuvo efecto sobre la capacidad de unión dinámica hasta 150 ciclos. La selectividad de la resina se investigó igualmente para MabSelect y MabSelect SuRe con bases estables utilizando la misma secuencia cromatográfica y proporcionó una calidad de producto HCP comparable.

5 Ejemplo 7--Purificación de dAb DAT06 usando proteína L, lavado con caprilato y tampón tris-acetato

DAT06, una molécula dAb de 11,5 kDa (V_k) expresada en *E. coli* se purificó utilizando proteína L (Capto L de GE Healthcare) empaquetada en una columna de 0,5 cm x 20 cm. El caudal fue de 300 cm/h para todas las etapas. 10 Despues del equilibrio con base tris 52 mM, ácido acético 48 mM, pH 7, el filtrado del cultivo celular se cargó a 13 mg/ml de resina. A continuación, se lavó la columna usando 5CV, base tris 52 mM, ácido acético 48 mM, caprilato de sodio 100 mM, pH 7, antes de ser reequilibrada, eluida, limpiada, desinfectada y almacenada. El análisis del pico de 15 elución arroja 5815 ppm de HCP mediante ELISA para una recuperación del 96,4 %. En comparación, la misma secuencia cromatográfica con tris 52 mM, ácido acético 48 mM, NaCl 2 M, etapa de lavado con alto contenido de sal a pH 7,0 proporciona 7476 ppm de HCP mediante ELISA y una recuperación del 85,1 %. Una etapa de lavado con el tampón de equilibrio, tris 52 mM, ácido acético 48 mM, pH 7,0 da 12.523 ppm de HCP mediante ELISA y una recuperación del 94,1 %.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína, a partir de una solución que contiene al menos un contaminante mediante cromatografía de superantígeno que comprende: a) adsorber la proteína al superantígeno inmovilizado sobre un soporte sólido; b) eliminar el al menos un contaminante poniendo en contacto el superantígeno inmovilizado que contiene la proteína adsorbida con un primer tampón de lavado que comprende caprilato de sodio aproximadamente 100 mM; y c) eluir la proteína del superantígeno inmovilizado sobre el soporte sólido, en donde el superantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteína A, proteína G y proteína L, en donde el al menos un contaminante es una proteína de la célula hospedadora o ADN de la célula hospedadora, en donde aproximadamente significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0,1\%$, y en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable de inmunoglobulina único, Fab, F(ab')2, Fv, Fv unido a disulfuro, scFv, scFv unido a disulfuro y diacuerpo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tampón de lavado comprende además acetato de sodio de 100 mM a 400 mM, o acetato de sodio 300 mM.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K562, células BHK, células PER.C6 y células HEK.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en agarosa, polimetacrilato, poli(estireno-divinilbenceno) reticulado y agarosa con extensor de superficie de dextrano.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución es una corriente de alimentación de cultivo celular.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tampón de lavado comprende además un ácido orgánico, una sal de metal alcalino o de amonio de la base conjugada del ácido orgánico y una base orgánica y en donde el tampón de lavado se prepara sin la adición de NaCl.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde (a) el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, glicina, glicilglicina, ácido succínico, TES (ácido 2-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}etanosulfónico}, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)), y MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) o (b) la base orgánica se selecciona del grupo que consiste en base tris, Bis-tris, Bis-tris propano, Bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico), TAPS (ácido 3-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}propanosulfónico) y Tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina).
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la base conjugada del ácido orgánico es la sal de sodio, potasio o amonio de la base conjugada del ácido orgánico.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde el ácido orgánico es ácido acético.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde la base orgánica es la base tris.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde el ácido orgánico es ácido acético y la base conjugada del ácido acético es la sal de sodio.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el superantígeno es la proteína A.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tampón de lavado comprende caprilato de sodio 100 mM.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína es un anticuerpo.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo es de la clase IgG.

Figura 1 Resultados del estudio de concentración de caprilato - anti-OSM

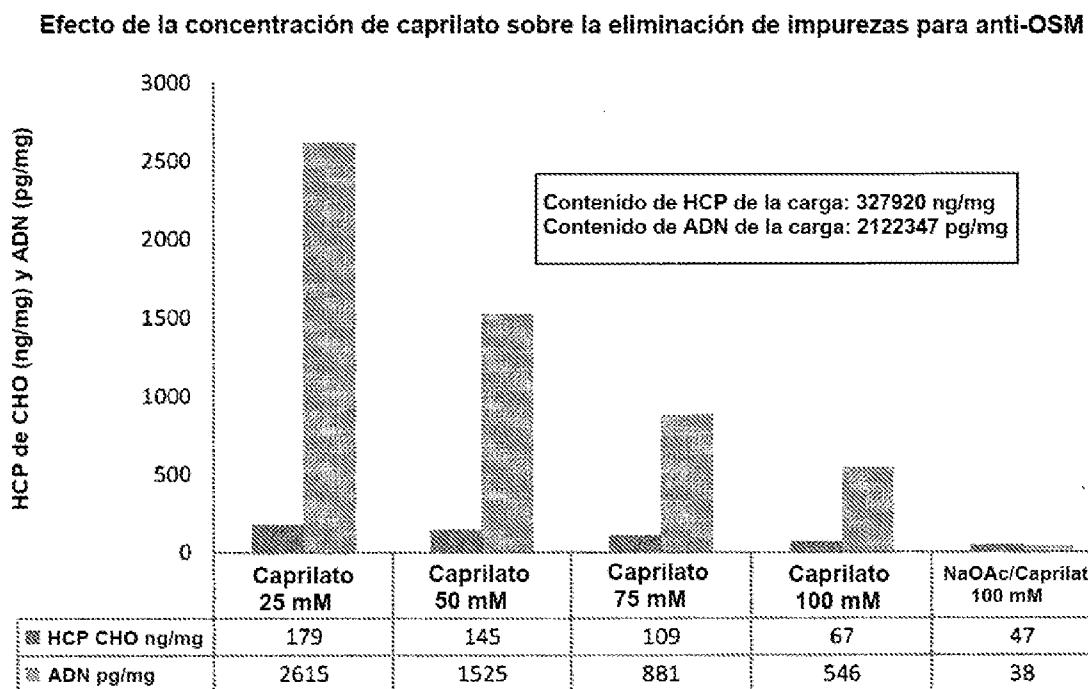


Figura 2 Resultados del estudio de concentración de caprilato - anti-IL13

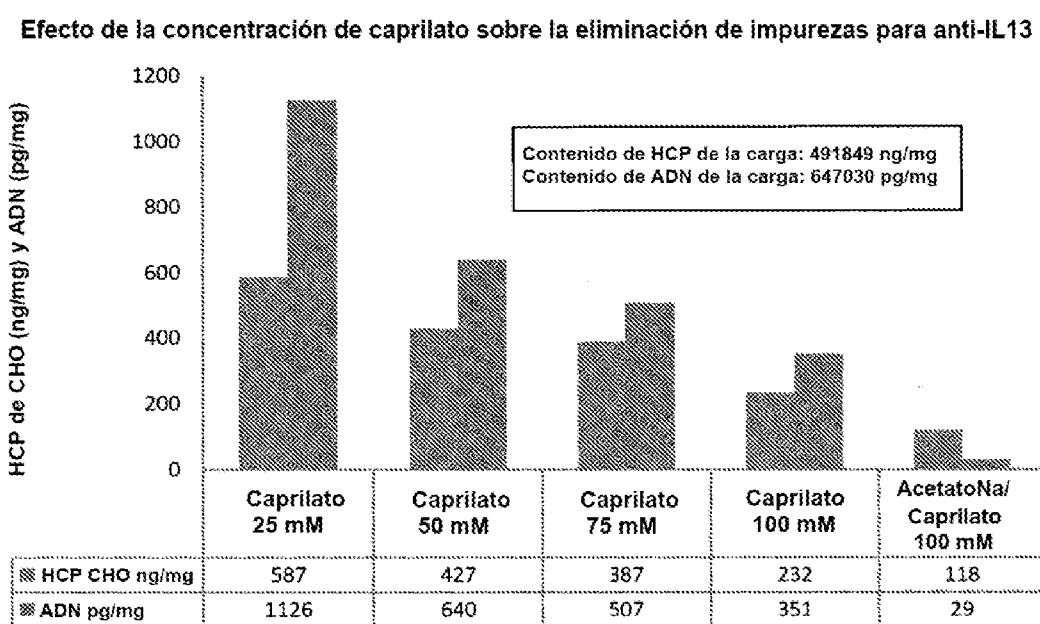


Figura 3 Resultados del estudio de comparación con ácido carboxílico

