



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 982 297**

⑮ Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 17188657 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3272764**

⑮ Título: **Método de cromatografía de afinidad**

⑯ Prioridad:

18.12.2009 US 288059 P

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

15.10.2024

⑮ Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

⑯ Inventor/es:

**FRAUENSCHUH, ACHIM y
BILL, KURT**

⑯ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 982 297 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de cromatografía de afinidad

5 Campo de la invención

Antecedentes de la invención

La cromatografía de afinidad permite la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla de moléculas, tal como una muestra de recolección celular, en función de la unión preferencial de la proteína de interés a una diana en fase sólida, tal como una matriz de gel. Este componente de fase sólida se forma habitualmente en una columna a través de la cual se aplica la mezcla que contiene la proteína de interés. En este paso inicial, denominado paso de captura, la proteína de interés se une específicamente a la diana en fase sólida, mientras que otros componentes de la mezcla fluyen a través de la columna. Sin embargo, ciertos componentes de la mezcla, que incluyen especies de alto peso molecular (APM), especies de bajo peso molecular (BPM) y proteínas de células hospedadoras (PCH), pueden permanecer dentro de la columna como impurezas junto con la proteína de interés. Por lo tanto, normalmente se llevan a cabo uno o más pasos de lavado en los que se aplican una o más soluciones de lavado a la columna para eliminar estas impurezas, a la vez que se mantiene la unión de la proteína de interés a la fase sólida. Finalmente, después de eliminar las impurezas con el (los) paso(s) de lavado, la proteína de interés se recupera de la columna mediante un paso de elución, en el que se aplica a la columna una solución de elución que altera la unión de la proteína de interés a la diana de la fase sólida, y la proteína de interés se recupera en el eluato. En consecuencia, la efectividad de la cromatografía de afinidad en la purificación de una proteína de interés depende en gran medida de la identificación de unas condiciones de lavado que permitan la eliminación eficaz de las impurezas (p. ej., especies de APM, BPM, PCH) sin alterar la unión de la proteína de interés a la diana de la fase sólida o sin ejercer de otro modo efectos no deseados.

Un tipo particularmente útil de cromatografía de afinidad es la cromatografía de proteína A para la purificación de proteínas que contienen una región de inmunoglobulina Fc, tales como anticuerpos y proteínas de fusión Fc. Se han descrito varias soluciones de lavado para eliminar las impurezas de las columnas de proteína A, que incluyen las soluciones de lavado que contienen uno de los siguientes: electrolitos hidrófobos (p. ej., cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio, cloruro de tetrapropilamonio o cloruro de tetrabutilamonio a pH 5,0-7,0), disolventes (p. ej., isopropanol o polipropilen/hexilenglicol al 5-20 %), urea (p. ej., con una concentración de 1-4 M), detergentes (p. ej., Tween 20 o Tween 80 al 0,1-1 %), polímeros (p. ej., polietilenglicol al 5-15 % tal como PEG400 o PEG8000) o soluciones tampón altamente concentradas tales como tampones de Tris, HCl, acetato, sulfato, fosfato o citrato con una concentración de 0,8-2,0 M a un pH de entre 5,0 y 7,0 (véase, p. ej., Shukla, A.A. y Hinckley, P. (2005) *Biotechnol. Prog.* 24:1115-1121; las Patentes de EE. UU. N.ºs 6 127 526 y 6 333 398 de Blank; y la Patente de EE. UU. N.º 6 870 034 de Breece *et al.*). Sin embargo, muchos de estos productos químicos presentan una o más desventajas, que incluyen, sin carácter limitante, toxicidad, corrosividad, inflamabilidad, inestabilidad, una eliminación costosa como residuos peligrosos y/o una eliminación ineficaz de los productos contaminantes durante el paso de lavado.

También se han descrito tampones de lavado para cromatografía de proteína A que contienen una sal (tal como cloruro de sodio), sola o combinada con un detergente (p. ej., Tween 20), un disolvente (p. ej., hexilenglicol) o un polímero (p. ej., polietilenglicol) (Patente de EE. UU. N.º 6 870 034 de Breece *et al.*).

Barron *et al.* describen una solución de lavado intermedia para cromatografía de proteína A que contiene arginina de 0,5 a 2,0 M en un tampón de fosfato/acetato a pH 5,0-7,5 (óptimamente arginina 1 M, tampón de fosfato/acetato 0,1 M a pH 5,0). Se explica que este paso de lavado con arginina elimina los contaminantes de PCH. Los autores también evaluaron una solución de lavado intermedia que contenía cloruro de sodio con una concentración de 0,5-2,0 M a pH 5,0-7,5, pero explicaron que el lavado con NaCl no mostró ninguna reducción significativa en PCH (Barron *et al.*, «Improving Purity on Protein A Affinity Media Through Use of an Arginine Intermediate Wash Step», <http://www.priorartdatabase.com/IPCOM/000127319>).

Sun *et al.* también describen un lavado de columnas de cromatografía de afinidad, tales como una columna de proteína A, con un tampón de lavado que contiene arginina, o un derivado de arginina, con una concentración de 0,1-2,0 M y a un pH de 4,5-8,0 (Publicaciones de Patente de EE. UU. N.ºs 20080064860 y 20080064861; Publicación de PCT N.º WO 2008/031020).

También se ha utilizado arginina para eluir proteínas de columnas de cromatografía de afinidad y otros tipos de columnas de purificación. Por ejemplo, Arakawa *et al.* describen métodos de elución de anticuerpos a partir de una columna de proteína A utilizando un tampón de elución que contiene arginina 0,5-2,0 M a pH 4,1-5,0 (Arakawa *et al.* (2004) *Protein Expression and Purification* 36:244-248; Tsumoto, K. *et al.* (2004) *Biotechnol. Prog.* 20:1301-1308; Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20050176109). Además, la Patente de EE. UU. N.º 7 501 495 de Ejima *et al.* describe métodos de elución de proteínas a partir de una columna de filtración en gel mediante el uso de una solución de desarrollo que contiene clorhidrato de arginina. Ghose *et al.* describen métodos de elución de proteínas de interés a partir de sílice no derivatizada utilizando un gradiente de arginina como eluyente (Ghose, S. *et al.* (2004) *Biotech. Bioeng.* 87:413-423). La Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20030050450 de Coffman *et al.* describe métodos de disociación de moléculas que contienen

Fc a partir de complejos de la molécula que contiene Fc y proteína A, en donde los complejos de Fc/proteína A se aplican a una columna de interacción hidrófoba (CIH) y la columna se lava con un tampón que contiene arginina.

Compendio de la invención

5

En el presente documento se describe una solución de lavado eficaz y consistente para cromatografía de afinidad, así como métodos de lavado que utilizan esta solución. Esta solución de lavado se aplica en un paso de lavado antes del paso de elución, y su uso da como resultado rendimientos elevados y concentraciones elevadas de la proteína de interés eludida de la matriz de afinidad, a la vez que se eliminan eficazmente tanto las especies de alto peso molecular (APM) como las proteínas de células hospedadoras (PCH) del material de partida aplicado a la matriz.

10

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un método para producir una proteína de interés purificada que es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (CA) a la que se une el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método: (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc en la matriz de CA; y (b) lavar la matriz de CA con dos o más soluciones de lavado que comprenden (i) arginina o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en arginina acilada, acetilarginina, N-alfa-butiroilarginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloilarginina, y (ii) una sal no tamponante, en donde la arginina, o el derivado de arginina, y la sal no tamponante se encuentran en diferentes soluciones de lavado, y en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de al menos 8,5, antes de la elución del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc de la matriz de CA; con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz de CA se selecciona del grupo que consiste en una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G y una columna de proteína L. Preferentemente, la proteína de interés se eluye de la matriz de CA después del lavado con la una o más soluciones de lavado, en particular, para eliminar las impurezas de la matriz de CA.

25

En una realización preferida, la matriz de CA es una columna de proteína A. En otras realizaciones diferentes, la matriz de CA se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en una columna de proteína G, una columna de proteína A/G, una columna de proteína L, una columna de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (CAMI), una columna de resina de calmodulina, una columna de MEP HyperCel™, una columna que se une a la proteína de unión a la maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), una columna que se une a la glutatión-S-transferasa (GST) y una columna que se une a Strep-Tag II. En una realización preferida, la proteína de interés es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la matriz de CA, tal como una columna de proteína A.

30

En una realización preferida, las soluciones de lavado comprenden arginina-HCl, preferentemente con una concentración en el intervalo de 0,05-2,0 M, más preferentemente en el intervalo de 0,05-0,85 M, más preferentemente en el intervalo de 0,1-0,5 M. En realizaciones particulares, la arginina-HCl está presente con una concentración de 0,1 M o aproximadamente 0,1 M, 0,25 M o aproximadamente 0,25 M, o 0,5 M o aproximadamente 0,5 M. En otras realizaciones, las soluciones de lavado comprenden un derivado de arginina, tal como un derivado seleccionado del grupo que consiste en acetilarginina, N-alfa-butiroilarginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloilarginina. Preferentemente, la arginina o el derivado de arginina comprende L-arginina, aunque también se engloba la D-arginina.

40

En una realización preferida, la sal no tamponante en las soluciones de lavado es cloruro de sodio (NaCl), preferentemente con una concentración en el intervalo de 0,1-2,0 M. En realizaciones particulares, el NaCl está presente con una concentración de 0,75 M o aproximadamente 0,75 M, 1,0 M o aproximadamente 1,0 M, o 1,25 M o aproximadamente 1,25 M. En otras realizaciones, la sal no tamponante en las soluciones de lavado se selecciona del grupo que consiste en cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio.

45

El pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de al menos 8,5 y preferentemente de al menos 8,9. En una realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, está en el intervalo de 8,5-9,5. En otra realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina es de aproximadamente 9,0. En otra realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de 9,0.

50

En otros métodos de lavado que no están cubiertos por las reivindicaciones, la combinación de lavado de arginina y sal no tamponante descrita en el presente documento se aplica en una única solución de lavado que contiene ambos componentes (es decir, la matriz de CA se lava con una solución de lavado que comprende tanto (i) arginina o un derivado de arginina; como (ii) una sal no tamponante). En los métodos de acuerdo con la presente invención, se utilizan dos soluciones de lavado, una que contiene arginina o un derivado de arginina (a un pH de al menos 8,5) y la otra que contiene una sal no tamponante, en lavados en tandem. En consecuencia, en tales métodos de lavado, la matriz de CA se lava con dos soluciones de lavado, una primera solución de lavado y una segunda solución de lavado. En una realización, la primera solución de lavado comprende arginina, o un derivado de arginina, y la segunda solución de lavado comprende una sal no tamponante. En otra realización, la primera solución de lavado comprende una sal no tamponante y la segunda solución de lavado comprende arginina o un derivado de arginina.

El método de lavado de la invención es eficaz en la eliminación de varias impurezas, que incluyen especies de alto peso molecular (APM) y proteínas de células hospedadoras (PCH).

Descripción detallada de la invención

- 5 En el presente documento se describe una nueva solución de lavado para una cromatografía de afinidad, tal como la cromatografía de proteína A, que se aplica a la columna antes de la elución de la proteína de interés para eliminar impurezas. La nueva solución de lavado consta de arginina, o un derivado de arginina, y una sal no tamponante. Habitualmente, la solución de lavado es una solución acuosa.
- 10 10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «sal no tamponante» se refiere a una sal que está presente en la solución de lavado que es de un tipo tal, y que está en una concentración tal, que no contribuye sustancialmente a mantener el pH de la(s) solución (soluciones) de lavado en las condiciones aplicadas (tales como pH elevado) tras la adición de ácido o base. Habitualmente, la sal no tamponante es una sal iónica. Las sales no tamponantes incluyen sales 15 de halógenos, que incluyen las que comprenden Cl o Br (más preferentemente Cl), en particular sales de halógenos que comprenden metales alcalinos o metales alcalinotérreos, que incluyen Na, K, Ca y Mg (más preferentemente Na o K). La expresión «sal no tamponante» no incluye sales tamponantes tales como acetato de sodio, fosfato de sodio y Tris, las cuales contribuyen sustancialmente a mantener el pH de una solución (soluciones) de lavado en las condiciones aplicadas. En una realización preferida, la sal no tamponante es una sal de halógeno (p. ej., que comprende Cl o Br). En otra 20 realización, la sal no tamponante es una sal de halógeno que comprende sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca) o magnesio (Mg), preferentemente sodio (Na) o potasio (K). En otra realización más, la sal no tamponante se selecciona del grupo que consiste en NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂. En una realización particularmente preferida, la sal no tamponante es cloruro de sodio (NaCl). Habitualmente, la sal no tamponante se utiliza con una concentración «elevada» de al menos 1 M. Más adelante se describen adicionalmente otras concentraciones e intervalos de concentración adecuados.
- 25 25 Esta nueva combinación de componentes de lavado elimina considerablemente más impurezas que los procedimientos utilizados habitualmente sin afectar a la recuperación. Además, esta condición de lavado da como resultado un pico de elución más nítido que se correlaciona con una mayor concentración de la proteína de interés en el eluato, lo que es ventajoso para aumentar el rendimiento de procesos de purificación posteriores adicionales.
- 30 30 La eliminación eficaz de impurezas, que incluyen proteínas de células hospedadoras (PCH) e impurezas relacionadas con el producto tales como especies de alto peso molecular (APM) y especies de bajo peso molecular (BPM), es un factor crucial durante el procesamiento posterior de una proteína de interés. La cromatografía de afinidad se utiliza a menudo como la primera etapa de un proceso de purificación de múltiples etapas para una proteína de interés (p. ej., un anticuerpo) 35 y la pureza de la proteína de interés después de la cromatografía de afinidad influye notablemente en el tipo y número de pasos de purificación posteriores. Otro papel importante de la cromatografía de afinidad es concentrar el producto, lo que permite el uso de columnas proporcionalmente más pequeñas y menos costosas en los pasos de purificación posteriores. Por lo tanto, es particularmente importante optimizar la eliminación de impurezas durante el paso de cromatografía de afinidad.
- 40 40 Unas condiciones de pH bajo, habitualmente entre pH 3 - 4, son un requisito para eluir la proteína de interés unida a partir de la matriz de afinidad y presentan el inconveniente de que pueden inducir potencialmente la agregación. Históricamente, se han utilizado unas condiciones menos rigurosas, tales como pH 5 - 5,5, para lavar las impurezas unidas de forma no específica a partir de la columna, conservando a la vez la interacción entre la proteína de interés y la matriz de afinidad. 45 La recuperación de la proteína de interés, sin embargo, a menudo se reduce debido a la elución parcial de la proteína de interés en estas condiciones, especialmente cuando se trabaja con altas densidades de carga. En consecuencia, la solución de lavado proporcionada por la presente invención se aplica ventajosamente a un pH elevado, al menos 8,5, lo que conserva la unión de la proteína de interés a la matriz de afinidad a la vez que permite la eliminación de impurezas.
- 50 50 La gran diversidad biofísica de las impurezas presentes en las muestras de recolección o extractos celulares comunes da como resultado modos muy diversos de interacciones con la fase sólida del medio cromatográfico y/o la proteína de interés unida. La conjugación más o menos fuerte de las impurezas puede ser el resultado de interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals o una combinación de estos tipos de interacciones. Por lo tanto, es probable que una combinación de 55 varios mecanismos diferentes para eliminar impurezas sea mucho más eficaz que una estrategia basada en un único mecanismo para eliminar impurezas.
- 60 60 Con respecto a los efectos de la sal no tamponante en la solución de lavado, basándose en los datos analíticos del presente documento, las interacciones de alta afinidad entre la proteína de interés y el ligando de la matriz de afinidad no se rompen mediante un lavado con concentraciones elevadas de sal no tamponante, mientras que los contaminantes cargados conjugados de manera no específica con residuos cargados en el ligando inmovilizado o en la proteína de interés unida se eliminan de manera eficaz. En consecuencia, aunque sin pretender limitarse a ningún mecanismo, se cree que la sal no tamponante utilizada en la solución de lavado tiene la capacidad de romper las interacciones iónicas entre contaminantes cargados (impurezas) conjugados de manera no específica con residuos cargados en uno o más componentes de la matriz de cromatografía de afinidad (p. ej., el soporte químico de la matriz, tal como una resina, el
- 65 65

ligando de afinidad inmovilizado en la matriz y/o la diana de interés unida al ligando inmovilizado en la matriz), sin alterar la unión específica de la diana unida al ligando inmovilizado.

5 Con respecto a los efectos de la arginina en la solución de lavado, se ha descrito que la arginina es capaz de solubilizar ciertas proteínas precipitadas (Umetsu, M. *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328:189-197; Tsumoto, K. *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1383-1386), reducir la formación de agregados (Arakawa, T. *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:148-152) y reducir la adsorción no específica de las proteínas a superficies (Ejima, D. *et al.* (2005) *J. Chromatogr. A.* 1094:49-55). Sin pretender limitarse a ningún mecanismo, la reducción de la agregación de las proteínas puede tener su origen en el enmascaramiento de parches hidrófobos en las proteínas, que interaccionan con la arginina. Esta interacción puede tener lugar entre el grupo guanidinio en los grupos de arginina y triptófano de las proteínas, o a través de la formación de un parche hidrófobo mediante una agrupación con la arginina, o puede ser una combinación de tales efectos.

10 15 Con respecto al uso de un pH de al menos 8,5 en la solución de lavado, un pH básico puede desnaturalizar parcialmente las PCG y las especies de APM, mientras que las proteínas estables, incluidos los anticuerpos monoméricos, no se ven influenciadas en estas condiciones. Sin pretender limitarse a ningún mecanismo, la desnaturalización de las proteínas contaminantes se puede manifestar como un ligero cambio en la estructura, que puede ser suficiente para debilitar la unión no específica. Por lo tanto, el pH elevado de la solución de lavado puede ser beneficioso para aumentar la eliminación de impurezas al desestabilizar su interacción con la proteína de interés unida o el soporte sólido de la matriz de afinidad.

20 25 En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc (la proteína de interés) purificado utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (CA) a la que se une el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc en la matriz de CA; y (b) lavar la matriz de CA con dos o más soluciones de lavado que comprenden (i) arginina o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en arginina acilada, acetilarginina, N-alfa-butiroilarginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloilarginina, y (ii) una sal no tamponante, en donde la arginina, o el derivado de arginina, y la sal no tamponante se encuentran en diferentes soluciones de lavado, y en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de al menos 8,5, antes de la elución del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc de la matriz de CA; con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz de CA se selecciona del grupo que consiste en una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G y una columna de proteína L.

30 35 40 Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión «matriz de cromatografía de afinidad» o «matriz de CA», se refiera a un medio de fase sólida, habitualmente un gel o una resina, que permite la separación de mezclas bioquímicas en función de una interacción de unión altamente específica entre una proteína de interés y la matriz de CA, tal como entre un receptor y un ligando, enzima y sustrato o antígeno y anticuerpo. Por lo tanto, el medio de fase sólida comprende una diana a la que la proteína de interés es capaz de adherirse de forma reversible, dependiendo de las condiciones tamponantes. Los ejemplos no limitantes de medios de fase sólida o inmovilizados que pueden comprender la matriz de CA incluyen una matriz de gel, tal como microesferas de agarosa (tales como las matrices de Sepharose disponibles en el mercado), y una matriz de vidrio, tal como microesferas de vidrio porosas (tales como las matrices de ProSep disponibles en el mercado).

45 50 55 La unión de la proteína de interés a la matriz de CA se consigue normalmente mediante cromatografía de columna. Es decir, la matriz de CA se forma en una columna, se hace fluir una mezcla bioquímica que contiene una proteína de interés a través de la columna, lo que va seguido de un lavado de la columna haciendo fluir a través de la columna una o más soluciones de lavado, lo que va seguido de la elución de la proteína de interés a partir de la columna haciendo fluir a través de la columna un tampón de elución.

Como alternativa, la unión de la proteína de interés a la matriz de CA se puede conseguir mediante un tratamiento por lotes, en el que las mezclas bioquímicas que contienen la proteína de interés se incuban con la matriz de CA en un recipiente para permitir la unión de la proteína de interés a la matriz de CA, el medio de fase sólida se retira del recipiente (p. ej., mediante centrifugación), el medio de fase sólida se lava para eliminar las impurezas y se recupera nuevamente (p. ej., mediante centrifugación) y la proteína de interés se eluye a partir del medio de fase sólida.

60 En otra realización más, se puede utilizar una combinación de tratamiento por lotes y cromatografía en columna. Por ejemplo, la unión inicial de la proteína de interés a la matriz de CA se puede conseguir mediante un tratamiento por lotes y a continuación el medio de fase sólida se puede empaquetar en una columna, lo que va seguido de un lavado de la columna y la elución de la proteína de interés a partir de la columna.

65 La naturaleza de una matriz de fase sólida particular, en particular las propiedades de unión de la diana adherida a la fase sólida, determina el (los) tipo(s) de proteína(s) que se puede(n) purificar utilizando esa matriz de fase sólida. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la matriz de CA es una columna de proteína A, que comprende como diana adherida a la fase sólida una proteína de la pared celular bacteriana, la proteína A, que se une específicamente a los

5 dominios CH₂ y CH₃ de la región Fc de ciertas inmunoglobulinas. Las propiedades de unión de la proteína A están muy bien establecidas en la técnica. En consecuencia, en una realización preferida de la invención, la proteína de interés (que se ha de purificar) es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región Fc. Además, otras proteínas que se pueden purificar utilizando una cromatografía con proteína A incluyen las proteínas de fusión Fc. Cualquier proteína que sea capaz de unirse específicamente a una matriz de proteína A, se podrá purificar de acuerdo con los métodos de la invención.

10 En la técnica se conocen varias resinas de proteína A y estas son adecuadas para su uso en la invención. Los ejemplos no limitantes de resinas de proteína A disponibles en el mercado incluyen MabSelect, MabSelect Xtra, MabSelect Sure, rProtein A Sepharose FF, rmpProtein A Sepharose FF, Protein A Sepharose CL-4B y nProtein A Sepharose 4 FF (todas ellas disponibles en el proveedor comercial GE Healthcare); ProSep A, ProSep-vA High Capacity, ProSep-vA Ultra y ProSep-Va Ultra Plus (todas ellas disponibles en el proveedor comercial Millipore); Poros A y Mabcapture A (ambas disponibles en el proveedor comercial Poros); IPA-300, IPA-400 e IPA-500 (todas ellas disponibles en el proveedor comercial RepliGen Corp.); Affigel protein A y Affiprep protein A (ambas disponibles en el proveedor comercial Bio-Rad); 15 MABsorbent A1P y MABsorbent A2P (ambas disponibles en el proveedor comercial Affinity Chromatography Ltd.); Protein A Ceramic Hyper D F (disponible en el proveedor comercial Pall Corporation); Ultralink de proteína A inmovilizada y de agarosa-proteína A (ambas disponibles en el proveedor comercial PIERCE); y Protein A Cellthru 300 y Protein A Ultraflow (ambas disponibles en el proveedor comercial Sterogen Bioseparations).

20 25 Además de la cromatografía de proteína A, el método de lavado de la invención se puede aplicar a otros sistemas de cromatografía de afinidad. Por ejemplo, en otra realización, la matriz de CA puede ser una columna de proteína G, una columna de proteína A/G o una columna de proteína L, cada una de las cuales consiste también en proteínas bacterianas que se unen a la inmunoglobulina con propiedades de unión establecidas en la técnica. Por lo tanto, una matriz de CA que sea una matriz de proteína G, una matriz de proteína A/G o una matriz de proteína L se puede utilizar para purificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que comprenden una región de Fc y proteínas de fusión Fc.

30 35 Otros ejemplos no limitantes de matrices de CA y los tipos de proteínas que son eficaces en la purificación incluyen los siguientes: una columna de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (CAMI) (para la purificación de proteínas con afinidad por iones metálicos, tales como proteínas con marca de histidina), una columna de resina de calmodulina (para la purificación de proteínas marcadas con un péptido de unión a la calmodulina (CBP)), una columna de MEP HyperCel™ (una matriz de celulosa que se une selectivamente a inmunoglobulina), una columna que se une a proteínas de unión a la maltosa (MBP) (tal como una resina Dextrin Sepharose™ que se une selectivamente a proteínas marcadas con MBP), una columna que se une a la glutatión-S-transferasa (GST) (tal como una resina Glutathione Sepharose™ que se une selectivamente a proteínas marcadas con GST) y una columna que se une a Strep-Tag II (tal como una resina Strep-Tactin Sepharose™ que se une selectivamente a proteínas marcadas con Strep-Tag II). Además, se pueden utilizar matrices de inmunoafinidad, que comprenden un anticuerpo como diana fijada en la fase sólida, para purificar un antígeno de interés que se une específicamente al anticuerpo fijado en la fase sólida.

40 45 Las soluciones de lavado utilizadas de acuerdo con la invención comprenden arginina o un derivado de arginina. La arginina que se puede utilizar en la presente invención puede ser el aminoácido natural arginina (p. ej., L-arginina), D-arginina o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en arginina acilada tal como acetilarginina y N-alfa-butiroilarginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloilarginina. La arginina o el derivado de arginina se puede utilizar en forma de una sal de adición de ácido. Los ejemplos del ácido que puede formar una sal de adición de ácido incluyen ácido clorhídrico y similares.

50 55 60 La concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado está habitualmente entre 0,05 M y 2,0 M (p. ej., es de 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,55 M, 0,6 M, 0,65 M, 0,7 M, 0,75 M, 0,8 M, 0,85 M, 0,9 M, 0,95 M, 1,0 M, 1,1 M, 1,15 M, 1,20 M, 1,25 M, 1,30 M, 1,35 M, 1,40 M, 1,45 M, 1,5 M, 1,55 M, 1,6 M, 1,65 M, 1,7 M, 1,75 M, 1,8 M, 1,85 M, 1,9 M, 1,95 M o 2,0 M), más preferentemente está entre 0,05 y 0,85 M (que es el límite superior de solubilidad de la arginina en agua a 20 °C) (p. ej., es de 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M, 0,55 M, 0,6 M, 0,65 M, 0,7 M, 0,75 M, 0,8 M o 0,85 M), con la mayor preferencia está entre 0,1 y 0,5 M (p. ej., es de 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M o 0,5 M). En diversas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina puede ser, por ejemplo, de 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M o 0,8 M, o puede estar entre 0,1 M y 0,5 M. En ciertas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado es de 0,25 M o superior. En realizaciones particulares, la arginina está presente con una concentración de 0,1 M o aproximadamente 0,1 M, 0,25 M o aproximadamente 0,25 M, o 0,5 M o aproximadamente 0,5 M.

65 Las soluciones de lavado de la invención también comprenden una sal no tamponante, tal como se ha descrito anteriormente, que es de un tipo tal y que está en una concentración tal que es suficiente para romper las interacciones iónicas entre las impurezas y uno o más componentes de la matriz de afinidad. En una realización preferida, la sal no tamponante es una sal de halógeno. En una realización particularmente preferida, la sal no tamponante es cloruro de sodio (NaCl). En otras realizaciones, la sal no tamponante puede ser, por ejemplo, cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂) o cloruro de magnesio (MgCl₂). La concentración de sal no tamponante en la solución de lavado habitualmente está entre 0,1 M y 2,0 M (p. ej., es de 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M,

- 0,55 M, 0,6 M, 0,65 M, 0,7 M, 0,75 M, 0,8 M, 0,85 M, 0,9 M, 0,95 M, 1,0 M, 1,1 M, 1,15 M, 1,20 M, 1,25 M, 1,30 M, 1,35 M, 1,40 M, 1,45 M, 1,5 M, 1,55 M, 1,6 M, 1,65 M, 1,7 M, 1,75 M, 1,8 M, 1,85 M, 1,9 M, 1,95 M o 2,0 M), o está entre 0,5 M y 1,5 M (p. ej., es de 0,5 M, 0,55 M, 0,6 M, 0,65 M, 0,7 M, 0,75 M, 0,8 M, 0,85 M, 0,9 M, 0,95 M, 1,0 M, 1,1 M, 1,15 M, 1,2 M, 1,25 M, 1,3 M, 1,35 M, 1,4 M, 1,45 M o 1,5 M), o está entre 1 M y 2 M (p. ej., es de 1 M, 1,1 M, 1,15 M, 1,2 M, 1,25 M, 1,3 M, 1,35 M, 1,4 M, 1,45 M, 1,5 M, 1,55 M, 1,6 M, 1,65 M, 1,7 M, 1,75 M, 1,8 M, 1,85 M, 1,9 M 1,95 M o 2 M). En ciertas realizaciones, la concentración de sal no tamponante en la solución de lavado es de 1 M o superior. En realizaciones particulares, la sal no tamponante en la solución de lavado está presente con una concentración de 0,75 M o aproximadamente 0,75 M, 1,0 M o aproximadamente 1,0 M, o 1,25 M o aproximadamente 1,25 M.
- 10 El pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, de la invención es de al menos 8,5 u 8,9. En una realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, está en el intervalo de 8,5-9,5. En otra realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de aproximadamente 9,0. En otra realización, el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de 9,0. Dependiendo de las propiedades de la proteína que se ha de purificar, el experto puede seleccionar un valor de pH adecuado para la solución de lavado. En consecuencia, la(s) solución (soluciones) de lavado puede(n) contener uno o más tampones para ajustar y/o mantener el pH. Los ejemplos no limitantes de tampones habituales que se pueden incluir en la(s) solución (soluciones) de lavado incluyen Tris (tris(hidroximetil)metilamina), bis-Tris, bis-Tris propano, histidina, trietanolamina, dietanolamina, formiato, acetato, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), fosfato, HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico), citrato, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), TAPS (ácido 3-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}propanosulfónico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), Tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina), TES (ácido 2-{{[tris(hidroximetil)metil]amino}etanosulfónico), PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-ethanosulfónico), cacodilato (ácido dimetilarsínico) y SSC (solución salina con citrato sódico).
- 15 En otros métodos que no están cubiertos por las reivindicaciones, la combinación de lavado de arginina y sal no tamponante descrita en el presente documento se puede aplicar en una única solución de lavado que contiene ambos componentes. En los métodos de acuerdo con la invención, se utilizan dos soluciones de lavado, una que contiene arginina o un derivado de arginina (a pH elevado) y la otra que contiene una sal no tamponante, en lavados en tandem. En consecuencia, en un método de lavado de este tipo, la matriz de CA se lava con dos soluciones de lavado, una primera solución de lavado y una segunda solución de lavado, antes de la elución de la proteína de interés. En una realización, la primera solución de lavado comprende arginina, o un derivado de arginina (a un pH de al menos 8,5), y la segunda solución de lavado comprende una sal no tamponante. En otra realización, la primera solución de lavado comprende una sal no tamponante y la segunda solución de lavado comprende arginina o un derivado de arginina (a un pH de al menos 8,5). Los ejemplos de derivados de arginina y sales no tamponantes adecuados, así como las concentraciones, intervalos de concentración y condiciones de pH preferidos para las soluciones de lavado son como se han descrito anteriormente.
- 20 35 El método de lavado de la invención es eficaz en la eliminación de varias impurezas, que incluyen especies de alto peso molecular (APM) y proteínas de células hospedadoras (PCH). Como se describe detalladamente en los Ejemplos, las soluciones de lavado de la invención son eficaces para reducir tanto las especies de APM como las PCH en el eluato, a la vez que se consigue un porcentaje de rendimiento elevado de la proteína de interés en el eluato y una concentración elevada de la proteína de interés en el eluato. Por ejemplo, en varias realizaciones, el uso del método de lavado descrito en el presente documento da como resultado un porcentaje de rendimiento de la proteína de interés que es superior a un 95 %, más preferentemente superior a un 96 %, aún más preferentemente superior a un 97 %. Con respecto a la reducción de las especies de APM en el eluato, que se puede expresar como el % de especies de APM en el eluato, en diversas realizaciones el uso del método de lavado descrito en el presente documento da como resultado un % de especies de APM en el eluato inferior a un 10 %, o inferior a un 5 %, o inferior a un 2,0 %, o inferior a un 1 %, o inferior a un 0,5 %. Con respecto a la reducción de las PCH en el eluato, que se puede expresar como el valor logarítmico de reducción (VLR), en diversas realizaciones el uso del método de lavado descrito en el presente documento da como resultado un VLR para las PCH en el eluato que es de al menos 1,1, o al menos 1,3, o al menos 1,5, o al menos 2,0, o al menos 2,3, o al menos 2,5, o al menos 2,7.
- 40 50 Aunque la invención se describe en el presente documento con respecto a un paso de lavado durante la cromatografía de afinidad, será muy evidente para el experto que se llevan a cabo pasos adicionales antes y después del paso de lavado para conseguir la purificación de la proteína de interés a partir de la matriz de la cromatografía de afinidad. Por ejemplo, antes del paso de lavado, los métodos de la invención pueden incluir un paso de equilibración, en el que la matriz de la cromatografía de afinidad se equilibra con un tampón de carga, y un paso de carga o captura, en el que se aplica una mezcla bioquímica (p. ej., muestra de recolección celular) que contiene la proteína de interés a la matriz de CA. Las condiciones adecuadas para los tampones de equilibración y carga variarán dependiendo de la naturaleza de la matriz de CA y la proteína de interés que se ha de purificar, y el experto puede determinar fácilmente tales condiciones utilizando métodos e información que están muy establecidos en la técnica. En los Ejemplos 1 y 2 se exponen ejemplos no limitantes de tampones de equilibración y carga para la purificación de anticuerpos en columnas de proteína A. Además, después del (de los) paso(s) de lavado como se ha mencionado anteriormente, los métodos de la invención pueden incluir uno o más pasos de lavado adicionales que utilizan soluciones de lavado comunes, y/o un paso de elución, en el que se aplica un tampón de elución a la matriz de la cromatografía de afinidad para eluir la proteína de interés a partir de la matriz. Las condiciones adecuadas para el tampón de elución variarán dependiendo de la naturaleza de la matriz de CA y la proteína de interés que se ha de purificar, y el experto puede determinar fácilmente tales condiciones utilizando métodos e

información que están muy establecidos en la técnica. Habitualmente, la elución de la proteína de interés a partir de la matriz de CA se lleva a cabo a un pH ácido.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación de la solución de lavado de arginina/sal no tamponante con otras soluciones de lavado

- 10 En este ejemplo de referencia, se compara la eficacia de varias soluciones de lavado para eliminar impurezas de una solución que contiene anticuerpo durante la cromatografía de afinidad. Más específicamente, se comparan tres soluciones de lavado: una que no contiene arginina ni sal no tamponante a pH 5,0, la segunda que contiene sal no tamponante pero no contiene arginina a pH 7,0 y la tercera que contiene sal no tamponante y arginina a pH 9,0.
- 15 Se recolectan los sobrenadantes clarificados de cultivos celulares de mamíferos que contienen entre 1,5 y 2,5 g/L de anticuerpo mediante filtración en profundidad y se purifican utilizando una columna de CLA, en particular una columna de proteína A (GE Healthcare), de acuerdo con las condiciones descritas a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Condiciones de operación de la columna de proteína A

Paso	Tampón	VC **	Tiempo de res. *
Equilibración	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7,0	6	4
Carga	Recolección sin células	c.s.	4
Lavado 1	Variable (véase la Tabla 2)	3	4
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7,0	3	4
Elución	Ácido acético 20 mM	4	4
CIP	NaOH 0,1 M	3	4
Almacenamiento	Ácido acético 20 mM/acetato de sodio, 2 % de alcohol bencílico, pH 5,1	4	4

* Tiempo de res. = tiempo de residencia; **: VC, volumen de columna

20

La columna equilibrada se carga con una muestra de recolección clarificada y en primer lugar se lava con la solución de lavado 1, que se describe en la Tabla 2 a continuación, lo que va seguido de un segundo lavado con la solución de lavado 2 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 M, pH 7,0) y a continuación se eluye a un pH bajo. El eluado se analiza para determinar su concentración de anticuerpo mediante CLA analítica, para determinar las especies de APM/BPM mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CET) analítica y para determinar el contenido de PCH mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, desarrollado en la misma línea celular. Las diversas soluciones de lavado comparadas para el primer lavado se muestran a continuación en la Tabla 2:

25

Tabla 2. Diferentes soluciones de lavado para el primer lavado

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	Acetato de sodio 20 mM, ácido acético 6 mM, pH 5,0	W1-A5
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, NaOH *, pH 9,0	W3-Arg/N9

* El pH se ajusta con una solución de NaOH al 32 %

35

Los porcentajes de rendimiento para la purificación con proteína A de cuatro anticuerpos monoclonales (mAb) diferentes, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 2, se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentajes de rendimiento de diferentes anticuerpos utilizando diversas soluciones de lavado

<u>Anticuerpo</u>	<u>Solución de lavado</u>		
	<u>W1-A5</u>	<u>W2-N7</u>	<u>W3-Arg/N9</u>
mAb-Qg	81,2	101,3	97,8
mAb-By	86,6	96,5	97,6
mAb-Bp	95,7	92,5	95,8
mAb-Va	96,5	97,9	98,6

La Tabla 3 muestra que el lavado con W1-A5 (que no contiene sal ni tamponante ni arginina, a pH 5,0) o W2-N7 (que contiene sal ni tamponante pero no contiene arginina, a pH 7,0) da como resultado fluctuaciones en la cantidad de anticuerpo recuperado dependiendo del anticuerpo que se esté purificando. Más concretamente, el lavado con W1-A5 da como resultado rendimientos que fluctúan entre un 81 y un 96 % y el lavado con W2-N7 da como resultado rendimientos que fluctúan entre un 92 y un 101 %. Por el contrario, el lavado con W3-Arg/N9, que contiene tanto sal ni tamponante ni arginina, a pH 9,0, da como resultado rendimientos sistemáticamente elevados, por encima de un 96 %, para los cuatro anticuerpos que se están purificando.

5

Las concentraciones en el eluato (en g/L), después de la purificación con proteína A de los cuatro mAb diferentes, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 2, se muestran a continuación en la Tabla 4.

10

Tabla 4. Concentración en el eluato de diferentes anticuerpos utilizando diversas soluciones de lavado

<u>Anticuerpo</u>	<u>Solución de lavado</u>		
	<u>W1-A5</u>	<u>W2-N7</u>	<u>W3-Arg/N9</u>
mAb-Qg	17,3	17,7	28,4
mAb-By	12,6	19,8	21,0
mAb-Bp	23,5	17,2	21,2
mAb-Va	15,1	14,3	16,4

La Tabla 4 muestra que la concentración en el eluato también se ve influenciada por el tampón de lavado aplicado durante la CLA. Para tres de los cuatro mAb (mAb Qg, By y Va), el lavado con W3-Arg/N9 da como resultado unas concentraciones en el eluato más elevadas que el lavado con W1-A5 o W2-N7. La concentración media en el eluato para los cuatro anticuerpos es la más baja después del lavado con W1-A5 (17,1 g/L), seguida por el lavado con W2-N7 (17,3 g/L) y es la más elevada después del lavado con W3-Arg/N9 (21,7 g/L).

20

La reducción de la proteína de células hospedadoras (PCH) en los eluatos después de la purificación con proteína A de los cuatro mAb diferentes, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 2, se muestra a continuación en la Tabla 5. La reducción en PCH se expresa como el valor logarítmico de reducción (VLR) con respecto a los valores en la muestra de recolección celular.

25

Tabla 5. Reducción de PCH en el eluato para diferentes anticuerpos utilizando varias soluciones de lavado

<u>Anticuerpo</u>	<u>Solución de lavado</u>		
	<u>W1-A5</u>	<u>W2-N7</u>	<u>W3-Arg/N9</u>
mAb-Qg	1,50	1,64	2,75
mAb-By	1,40	1,68	2,15
mAb-Bp	1,77	1,88	2,53
mAb-Va	0,94	0,99	1,33

30

Con respecto a la eliminación de impurezas, basándose en los datos de la Tabla 5, se puede establecer un orden claro entre los tres tampones de lavado. La reducción de PCH más pequeña se obtiene con el lavado de pH bajo W1-A5, seguida por el lavado con la solución de lavado que contiene sal W2-N7, y el factor de eliminación más elevado se obtiene con el tampón combinado de arginina-NaCl a pH 9,0 (W3-Arg/N9). Expresándose en orden logarítmico de eliminación, se

obtiene un promedio de 1,4 log después del lavado con W1-A5, 1,55 log con W2-N7 y la eliminación más alta de 2,2 log se consigue con W3-Arg/N9.

5 El nivel de especies de alto peso molecular (APM) en los eluatos después de la purificación con proteína A de los cuatro mAb diferentes, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 2, se muestra a continuación en la Tabla 6. El nivel de especies de APM en los eluatos se expresa como un porcentaje (%) de la proteína total en los eluatos.

Tabla 6. Nivel de especies de APM en el eluato para diferentes anticuerpos utilizando varias soluciones de lavado

<u>Anticuerpo</u>	<u>Solución de lavado</u>		
	<u>W1-A5</u>	<u>W2-N7</u>	<u>W3-Arg/N9</u>
mAb-Qg	4,7	3,8	0,8
mAb-By	2,1	0,7	0,4
mAb-Bp	10,4	10	9,8
mAb-Va	4,1	2,9	1,6

10

La Tabla 6 muestra que el nivel de especies de APM es muy heterogéneo para los 4 mAb diferentes y la eliminación de las especies de APM depende del mAb. En general, la solución de lavado W1-A5 es la solución de lavado menos eficaz. Se obtienen mejores resultados con la solución de lavado W2-N7 y se observan los valores más bajos de especies de APM en el eluato de CLA sistemáticamente con la solución de lavado W3-Arg/N9. Tres mAb (mAb Qg, By y Va) responden con una reducción de 2,6 a 5,9 veces en las especies de APM comparando el lavado con W1-A5 frente al lavado con W3-Arg/N9, mientras que el mAb-Bp solo mostró una reducción marginal.

15 20 En la Tabla 7 a continuación se presenta un resumen de los resultados de los experimentos que se resumen en las Tablas 3-6 anteriores. La fila sombreada representa la composición de la muestra de recolección.

Tabla 7. Comparación de tres soluciones de lavado de CLA para cuatro mAb

mAb	Tampón de lavado	Rendimiento [%]	Conec. [g/L]	PCH [ppm]	PCH [VLR]	APM [%]
Va	Muestra de recolección	NA	1,63	337739	NA	NA
Va	Acetato pH 5,0	96,5	15,1	38620	0,94	4,1
Va	NaCl pH 7,0	97,9	14,3	34522	0,99	2,9
Va	Arg/NaCl pH 9,0	98,6	16,4	15618	1,33	1,6
Qg	Muestra de recolección	NA	1,63	645236	NA	NA
Qg	Acetato pH 5,0	81,2	17,3	20393	1,500237	4,7
Qg	NaCl pH 7,0	101,3	17,7	14673	1,6432	3,8
Qg	Arg/NaCl pH 9,0	97,8	28,4	1150	2,749021	0,8
By	Muestra de recolección	NA	1,63	528126	NA	NA
By	Acetato pH 5,0	86,6	12,6	20955	1,401614	2,1
By	NaCl pH 7,0	96,5	19,8	11111	1,677149	0,7
By	Arg/NaCl pH 9,0	97,6	21,0	3738	2,150263	0,4
Bp	Muestra de recolección	NA	1,63	523131	NA	NA
Bp	Acetato pH 5,0	95,7	23,5	8830	1,7727	10,4
Bp	NaCl pH 7,0	92,5	17,2	6845	1,883287	10
Bp	Arg/NaCl pH 9,0	95,8	21,2	1543	2,530294	9,8

Conec. = concentración en el eluato; PCH = proteína de células hospedadoras; APM = especies de alto peso molecular; VLR = valor logarítmico de reducción; NA = no aplicable.

25

Ejemplo 2: Comparación de varias soluciones de lavado de arginina/sal

En este ejemplo de referencia, se compara la eficacia de soluciones de lavado adicionales, que contienen diferentes cantidades de sal no tamponante y/o arginina a diferentes valores de pH, para eliminar impurezas durante la cromatografía

líquida de afinidad (CLA). Las condiciones de cromatografía utilizadas en este Ejemplo se exponen en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8. Condiciones de operación de la columna de proteína A

Paso	Tampón	VC **	Tiempo de res. * (min)
Equilibración 1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7,0	3	4
Equilibración 2	Idéntico al tampón de lavado 1	3	4
Carga	Recolección sin células	c.s.	4
Lavado 1	Variable (véase la Tabla 9)	6	4
Lavado 2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 7,0	3	4
Elución	Ácido acético 50 mM	5	4
CIP	NaOH 0,1 M	3	4
Almacenamiento	Ácido acético 20 mM/acetato de sodio, 2 % de alcohol benzílico, pH 5,1	5	4

* Tiempo de res. = tiempo de residencia; **: VC, volumen de columna

5

Las soluciones de lavado comparadas en este Ejemplo se exponen a continuación en la Tabla 9:

Tabla 2. Varias soluciones de lavado adicionales para el primer lavado

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0	W4-0,15M N7
3	Arginina-HCl 250 mM, Tris-HCl ~18 * mM, pH 8,0	W5-Arg8
4	Tris-HCl ~18 * mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, pH 8,0	W6-Arg/N8

* No se midió la concentración exacta (se utilizó la base Tris 1 M [(hidroximetil)aminometano] para ajustar el pH)

10

Las cuatro soluciones de lavado mostradas en la Tabla 9 permiten comparar directamente una solución de lavado con un contenido bajo de sal no tamponante (W4-0,15M N7, que contiene NaCl 150 mM) con una solución de lavado con un contenido elevado de sal no tamponante (W2-N7, que contiene NaCl 1 M), así como comparar una solución de lavado que contiene arginina sola a pH 8,0 (W5-Arg8) con una solución de lavado que contiene la combinación de sal no tamponante con arginina a pH básico (W6-Arg/N8).

15

El porcentaje de rendimiento, el porcentaje de especies de APM en el eluato y la reducción de PCH (expresada como VLR) para la purificación de mAb-By, utilizando las cuatro soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 9, así como la combinación del lavado de arginina sola (W5-Arg8) con el lavado con un contenido elevado de sal solo (W2-N7), se muestran a continuación en la Tabla 10.

20

Tabla 10. Valores de purificación para mAb-By utilizando varias soluciones de lavado

Valor de Purificación	Solución de lavado				
	W4-0,15M N7	W2-N7 LW *	W5-Arg8	W5-Arg8, W2-N7	W6-Arg/N8
Rendimiento (%)	98,4	100	99,3	97,4	97,9
APM (%)	1,6	0,9	0,5	0,3	0,3
PCH (VLR)	1,81	2,19	2,35	2,57	2,7

* LW = el lavado se realizó para 12 volúmenes de columna en lugar de 6.

25

La Tabla 10 muestra que el porcentaje de rendimiento del anticuerpo se mantiene por encima de un 97 % para todas las condiciones de lavado. Además, las soluciones de lavado más eficaces para la eliminación de impurezas, tanto de APM como de PCH, son la solución de lavado que contiene tanto arginina como un contenido elevado de sal no tamponante a

pH básico (W6-Arg/N8) o el uso combinado de las soluciones de lavado que contienen arginina a pH básico (W5-Arg8) y un contenido elevado de sal no tamponante (W2-N7).

5 El lavado con una solución de lavado más bien fisiológica, W4-0,15M N7, reduce la PCH en 64 veces (1,81 log) en comparación con el material de partida que se carga en la columna. Por el contrario, el lavado con una combinación de sal no tamponante-arginina a pH 8 (W6-Arg/N8) da como resultado una reducción de 498 veces (2,7 log).

10 La reducción de las especies APM sigue una tendencia similar. El lavado con la solución de lavado que contiene fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 (W4-0,15M N7) da como resultado un 1,6 % de especies APM en el eluato, mientras que el lavado con la combinación de sal no tamponante-arginina (W6-Arg/N8) reduce este valor en más de 5 veces.

Ejemplo 3: Comparación del pH básico con el pH fisiológico en las soluciones de lavado

15 En este ejemplo de referencia, se realiza un análisis del efecto del pH como parámetro de las soluciones de lavado sobre la eliminación de PCH y especies de APM y este muestra la superioridad de las condiciones de pH básico. Se realiza una cromatografía líquida de afinidad (CLA) utilizando las condiciones expuestas en la Tabla 8 del Ejemplo 2 en una muestra de recolección celular de mAb-Va, con niveles ligeramente diferentes de especies de APM y PCH.

20 Las soluciones de lavado comparadas en este Ejemplo se exponen a continuación en la Tabla 11:

Tabla 11. Soluciones de lavado con diferentes valores de pH para el primer lavado (en mAb-Va)

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7
2	Na ₂ HPO ₄ 13,2 mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, pH 7,0	W6-Arg/N7
3	Tris ~ 289 mM *, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, pH 8,9	W3b-Arg/N8,9

* No se utilizó NaOH para el ajuste del pH

25 El porcentaje de rendimiento, el porcentaje de especies de APM en el eluato y la reducción de PCH (expresada como VLR) para la purificación de mAb-Va, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 11, se muestran a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación del pH fisiológico con el pH básico en los valores de purificación para mAb-Va

Valor de purificación	Solución de lavado		
	W2-N7	W6-Arg/N7	W3b-Arg/N8,9
Rendimiento (%)	100,5	99,4	99
APM (%)	2,4	1,6	1,4
PCH (VLR)	0,87	1,48	1,61

30

La solución de lavado con solo un contenido elevado de sal no tamponante, W2-N7, sirve como un lavado de control de referencia para establecer la capacidad de eliminación de PCH/APM de la combinación de arginina/sal no tamponante a un pH aproximadamente fisiológico de 7,0 (solución de lavado W6-Arg/N7) y a un pH básico de 8,9 (solución de lavado W3b-Arg/N8,9). Se observa una reducción pequeña pero apreciable de los niveles de especies de APM de un 1,6 a un 1,4 % en el pH más elevado (pH 8,9) en comparación con el pH más bajo (pH 7,0). El efecto sobre la eliminación de PCH es más evidente. En este caso, el lavado de pH más bajo (pH 7,0) reduce las PCH en 1,48 log, mientras que el lavado de pH elevado (pH 8,9) reduce el valor en 1,61 log, lo que pone de manifiesto la superioridad del lavado de pH elevado en la capacidad de eliminación de impurezas.

40

Ejemplo 4: Comparación de la solución de lavado de arginina/sal con otras soluciones de lavado

45 En este ejemplo de referencia, se comparan otras soluciones de lavado, que contienen Tween 80, aminoácidos distintos de arginina o altas concentraciones de Tris, con las soluciones de lavado de arginina/sal no tamponante. En este ejemplo, se realiza un análisis del efecto del pH como parámetro de las soluciones de lavado sobre la eliminación de PCH y especies de APM y este muestra la superioridad de las condiciones de pH básico. Se realiza una cromatografía líquida de afinidad (CLA) utilizando las condiciones expuestas en la Tabla 1 del Ejemplo 1 en una muestra de recolección celular de mAb-Va, con niveles ligeramente diferentes de especies de APM y PCH.

Las soluciones de lavado comparadas en este Ejemplo se exponen a continuación en la Tabla 13:

Tabla 13. Soluciones de lavado con diferentes componentes para el primer lavado

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7 LW *
3	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, Tween 80 al 0,1 % (p/v), pH 7,0	W7-N7-T80
4	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, Glicina 0,1 M, Tris **	W8-N7-0,1 M G
5	Tris 500 mM, pH 8,9	W9-0,5 M Tris 8,9 LW*
6	Tris 289 mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, pH 8,9	W3b-Arg/N8,9

* LW = el lavado se realizó para 12 volúmenes de columna en lugar de 6. ** el pH se ajustó con solución madre 1 M, no se midió la conc.

5

El porcentaje de rendimiento, el porcentaje de especies de APM en el eluato y la reducción de PCH (expresada como VLR) para la purificación de mAb-Va, utilizando las seis soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 13, se muestran a continuación en la Tabla 14.

10

Tabla 14. Comparación de los componentes de la solución de lavado en los valores de purificación para mAb-Va

	Solución de lavado					
Valor de Purificación	W2-N7	W2-N7 LW *	W7-N7-T80	W8-N7-0,1 M G	W9-0,5 M Tris 8,9 LW*	W3b-Arg/N8,9
Rendimiento (%)	100,5	100,9	99	98,7	98,1	99
APM (%)	2,4	2,3	2,5	3,1	3	1,4
PCH (VLR)	0,87	1,42	1,34	1,24	1,07	1,61

* LW = el lavado se realizó para 12 volúmenes de columna en lugar de 6.

15

La Tabla 14 muestra que la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a un pH elevado (W3b-Arg/N8,9) es la solución de lavado más eficaz para eliminar tanto especies de APM como de PCH, en comparación con otras soluciones de lavado que contienen solo un contenido elevado de sal no tamponante (W2-N7), Tween 80 (W7-N7-T80), otros aminoácidos tales como glicina (W8-N7-0,1 M G) o concentraciones elevadas de Tris (W9-0,5 M Tris 8,9 LW).

Ejemplo 5: Comparación de la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a un pH elevado con la sal sola a un pH bajo y elevado

20

En este ejemplo de referencia, se compara la eficacia de la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a un pH elevado con una solución de sal no tamponante a un pH elevado y bajo. Concretamente, se evalúan y comparan las siguientes condiciones: (1) solución de lavado de sal no tamponante a un pH bajo (es decir, 7,0), (2) solución de lavado de sal no tamponante a un pH elevado (es decir, 9,0) y (3) solución de lavado de sal no tamponante combinada con arginina a un pH elevado (es decir, 9,0). Además, se analiza el efecto de la arginina sobre la eliminación de especies de APM, BPM y PCH, y se observa que el uso de la solución de sal no tamponante combinada con arginina en condiciones de pH básico es particularmente eficaz y ventajoso. Las soluciones de lavado comparadas en este Ejemplo se exponen a continuación en la Tabla 15:

25

Tabla 15. Soluciones de lavado con diferentes componentes para el primer lavado

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,0	W2-N7
2	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1000 mM, NaOH, pH 9,0 *	W10-N9
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 250 mM, NaCl 1 M, NaOH, pH 9,0 *	W3-Arg/N9

* el pH se ajustó hasta 9,0 con solución madre de NaOH al 32 %.

La cromatografía líquida de afinidad (CLA) utilizando las condiciones expuestas en la Tabla 1 del Ejemplo 1 se realiza en una muestra de recolección celular de mAb-By, utilizando diferentes niveles de especies de APM y PCH con variaciones mínimas, tal como se detalla a continuación en la Tabla 16.

5 **Tabla 16. Condiciones de operación de la columna de proteína A**

Paso	Tampón	VC	Tiempo de res. **	Comentario
Equilibración	NaH ₂ /Na ₂ H-PO ₄ 20 mM, pH 7,0	5/6*	4	
Carga	Recolección sin células		4	36 mg/ml de resina
Lavado 1	Véase la Tabla 15	6	4	
Lavado 2	EQ	3	4	
Elución	Ácido acético 20 Mm, pH tc***	5/4*	4	100-100 mUA a 280 nm
CIP	NaOH 0,1 M	4	4	
Almacenamiento	Na-acetato 20 mM, alcohol bencílico al 2 %, pH 5,1	5/4*	4	

* para el experimento con la solución de lavado W3-Arg/N9, se utilizaron 6 VC para la equilibración y se utilizaron 4 VC para la elución y el almacenamiento. ** Tiempo de res. = tiempo de residencia. *** tc = tal cual (como está)

10 Se midieron los parámetros de (1) concentración de anticuerpo obtenida por CET (g/L), (2) porcentaje de especies de APM y BPM, (3) nivel de PCH expresado en ng/mg de anticuerpo monoclonal y (4) porcentaje de rendimiento obtenido por CLA en el eluado de CLA para la purificación de mAb-By, utilizando las tres soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 15. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 17.

15 **Tabla 17. Comparación de los componentes de la solución de lavado en los valores de purificación para mAb-By**

Solución de lavado	Conc. (g/L)	APM (%)	BPM (%)	PCH (ng/mg de MAB)	Rendimiento (%)
Material de partida	2,32	NA	NA	370962	(100)
W2-N7	20,00/19,84*	1,3/0,9*	0,4/0,4*	9315/6783*	100,8/ND*
W10-N9	20,28/20,10*	1,2/1,0*	0,5/0,5*	8984/7884*	101,9/ND*
W3-Arg/N9	20,55	0,8	0,1	2110	100,3/ND*

* el segundo valor corresponde a una segunda medición después de una filtración a través de un filtro de 0,2 µm.

15 Concretamente, la Tabla 17 muestra que la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a un pH elevado de 9,0 (W3-Arg/N9) es la solución de lavado más eficaz para eliminar las especies de APM, BPM y PCH, en comparación con otras soluciones de lavado que contienen solo la sal no tamponante (W2-N7 y W10-N9), independientemente de su pH. En particular, el lavado con la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a un pH de 9,0 redujo las especies de PCH al menos 3 veces y las especies de BPM al menos 4 veces, en comparación con el lavado con solo la sal no tamponante a un pH de 7 (W2-N7) o un pH de 9 (W10-N9).

20 **Ejemplo 6: Comparación de intervalos de concentraciones de arginina y NaCl y pH para la solución de lavado de arginina/sal**

25 En este ejemplo de referencia, se investigan concentraciones adicionales de arginina y sal no tamponante y condiciones de lavado de pH para determinar su eficacia en la eliminación de impurezas durante la cromatografía líquida de afinidad (CLA). Las soluciones de lavado comparadas en este Ejemplo se exponen a continuación en la Tabla 18:

30 **Tabla 18. Soluciones de lavado con diferentes componentes para el primer lavado**

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
1	NaCl 0,75 M, L-Arginina/Tris 250 mM, pH 8,5 *	W11-Arg/N8,5
2	NaCl 1,25 M, L-Arginina/Tris 250 mM, pH 9,5 *	W12-Arg/N9,5
3	Tris 50 mM, Arginina-HCl 500 mM, NaCl 1 M, NaOH, pH 9,0 *	W13-Arg/N9
4	Tris 10 mM, Arginina-HCl 100 mM, NaCl 1 M, NaOH, pH 9,0 *	W14-Arg/N9 **

Solución	Tampón	Abreviatura del tampón
* el pH se ajustó con NaOH 8 M; ** el tampón se obtuvo mediante una dilución de 5 veces de W13-Arg/N9 y el pH se ajustó hasta 9,0 con NaOH 8 M		

La CLA se realiza en una muestra de recolección celular de mAb-By (en las condiciones expuestas en la Tabla 1 del Ejemplo 1), utilizando niveles ligeramente diferentes de especies de APM y PCH con variaciones mínimas, tal como se detalla a continuación en la Tabla 19.

5

Tabla 19. Condiciones de operación de la columna de proteína A (para un tiempo de res. de 4 min)⁺

Paso	Tampón	VC	Comentario
Equilibración	NaH ₂ -/Na ₂ H-PO ₄ 20 mM, pH 7,0	6	
Carga	Recolección sin células		38 mg/mL de resina
Lavado 1	Véase la Tabla 18	4,5*/7,5**/6****	
Lavado 2	EQ	3	
Elución	Ácido acético 50 mM, pH 3,5 */**/*** o ácido acético 50 mM, pH 3,8 ****/****	4/6****	500-500 mUA/cm a 280 nm
CIP	NaOH 0,1 M	4/3****	Flujo hacia arriba
Almacenamiento	Na-acetato 20 mM, alcohol bencílico al 2 %, pH 5,1	4	Flujo hacia arriba

* para el experimento con la solución de lavado W11-Arg/N8,5; ** para el experimento con la solución de lavado W12-Arg/N9,5; *** el pH se ajustó con Tris 1 M; **** para el experimento con la solución de lavado W13-Arg/N9 y W14-Arg/N9; ***** el pH se ajustó con NaOH 8 M. ⁺ Tiempo de res. = tiempo de residencia.

10 Se midieron los parámetros de (1) concentración de anticuerpo obtenida por CET (g/L), (2) porcentaje de especies de APM y BPM (%), (3) nivel de PCH expresado en ng/mg de anticuerpo monoclonal y (4) porcentaje de rendimiento obtenido por CLA en el eluado de CLA después de la purificación de mAb-By, utilizando cada una de las dos soluciones de lavado diferentes que se muestran en la Tabla 18. Estos resultados se muestran a continuación en la Tabla 20.

15 **Tabla 20. Eficiencia del tampón de lavado a diferentes concentraciones de NaCl y niveles de pH para la purificación de mAb-By (dos materiales de partida diferentes)**

Solución de lavado aplicada	Concentración (CET) (mg/mL)	APM (%)	BPM (%)	PCH (ng/mg)	Rendimiento (CLA) (%)
Material de partida	2,6	NA	NA	602398	(100)
W12-Arg/N9,5	27,35	2,1	0,3	4637	100,4
W11-Arg/N8,5	22,42	2,1	0,5	9922	100,2
Material de partida	2,91	NA	NA	311761	(100)
W13-Arg/N9	16,15	1,7	0,1	1367	98,7
W14-Arg/N9	16,31	1,7	0,1	3405	95,9

20 Los datos mostrados en la Tabla 20 subrayan la eficacia de la solución de lavado de arginina/sal no tamponante a pH elevado, para su uso en cromatografía líquida de afinidad. El lavado con (1) arginina y una concentración más baja de sal no tamponante (NaCl 0,75 M) a un pH de 8,5, (2) arginina y una concentración más elevada de sal no tamponante (NaCl 1,25 M) a un pH de 9,5 o (3) concentraciones bajas (p. ej., 100 mM) o elevadas (p. ej., 500 mM) de arginina, da como resultado una fuerte reducción de las especies de PCH (en promedio > 2 log de reducción), sin que se vea afectado el rendimiento.

25

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc purificado, utilizando una matriz de cromatografía de afinidad (CA) a la que se une el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc, comprendiendo el método:
5 (a) cargar una mezcla que comprende el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc en la matriz de CA; y
- 10 (b) lavar la matriz de CA con dos o más soluciones de lavado que comprenden (i) arginina o un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en arginina acilada, acetilarginina, N-alfa-butiroilarginina, agmatina, ácido argínico y N-alfa-pivaloilarginina, y (ii) una sal no tamponante, en donde la arginina, o el derivado de arginina, y la sal no tamponante se encuentran en diferentes soluciones de lavado, y en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de al menos 8,5, antes de la elución del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fc de la matriz de CA;
15 con la condición de que si se produce una proteína de fusión Fc purificada, la matriz de CA sea una matriz de proteína A, una matriz de proteína G, una matriz de proteína A/G y una matriz de proteína L.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz de CA es una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G o una columna de proteína L.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la sal no tamponante es una sal de halógeno.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde la sal no tamponante es cloruro de sodio (NaCl).
5. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz de CA se lava con dos soluciones de lavado, una primera solución de lavado y una segunda solución de lavado, en donde:
30 (a) la primera solución de lavado comprende arginina, o el derivado de arginina, y la segunda solución de lavado comprende la sal no tamponante; o
(b) la primera solución de lavado comprende la sal no tamponante y la segunda solución de lavado comprende arginina o el derivado de arginina;
35 y en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de al menos 8,5.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la columna de proteína A.
40 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la una o más soluciones de lavado eliminan impurezas de la matriz de CA.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la arginina o derivado de arginina está en una concentración comprendida en el intervalo de 0,05-2,0 M.
45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la arginina es arginina-HCl.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la sal no tamponante está en una concentración comprendida en el intervalo de 0,1-2,0 M.
50 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, está en el intervalo de aproximadamente 8,5-9,5.
- 55 12. El método de la reivindicación 11, en donde el pH de la solución de lavado que comprende arginina, o un derivado de arginina, es de 9,0.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde las impurezas comprenden especies de alto peso molecular (APM).
60 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en donde las impurezas comprenden proteínas de células hospedadoras (PCH).