

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 532**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22	(2006.01)
C07K 16/10	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)
C07K 16/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2016 PCT/EP2016/069604**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17032686**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016 E 16757608 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3337812**

54 Título: **Procedimiento para la reducción de proteínas de célula huésped en cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

21.08.2015 US 201562208523 P

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

17.11.2021

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH y
GENENTECH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCDONALD, PAUL;
ST. JOHN, RICHARD;
WONG, MARC;
FALKENSTEIN, ROBERTO;
KOEHNLEIN, WOLFGANG;
SCHWENDNER, KLAUS;
SPENSBERGER, BERNHARD;
WIEDMANN, MICHAEL;
ZETTL, FRANK;
KLEINJANS, ANNIKA;
KOPP, CARINA;
TRAN, BENJAMIN y
ERICKSON, RYAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 877 532 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción de proteínas de célula huésped en cromatografía de afinidad

5 La presente invención se refiere al campo de la purificación de polipéptidos. La presente invención en particular se refiere a la reducción de proteínas de célula huésped como fosfolipasa de tipo B 2 (*phospholipase B-like 2*, PLBL2) o clusterina en soluciones que contienen anticuerpos.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas y en especial las inmunoglobulinas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Para su aplicación en humanos, cada proteína terapéutica tiene que cumplir criterios distintos. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en humanos, en especial se han de retirar los subproductos que se acumulan durante el procedimiento de producción. Para cumplir las especificaciones reglamentarias, una o más etapas de purificación han de seguir el procedimiento de fabricación. Entre otras, la pureza, producción y rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación de un procedimiento de purificación apropiado.

15 Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G, cromatografía de afinidad de ligando de Fv monocatenario), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de sulfopropilo o carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio iónico mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar).

20 Para la purificación de inmunoglobulinas producidas de forma recombinante a menudo se emplea una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. Durante la purificación, se disminuyen los contaminantes distintos de inmunoglobulinas tales como proteína de célula huésped y ADN de célula huésped así como endotoxinas y virus. Por lo tanto, en general una etapa de cromatografía de afinidad, como la cromatografía de afinidad de proteína A va seguida de una o más etapas de separación adicionales. En general, se describe que los tampones de conductividad alta se emplean en etapas de lavado de procedimientos de cromatografía de afinidad.

35 En el documento US 6.127.526 se describe un procedimiento para purificar proteínas por cromatografía de proteína A que comprende las etapas de: (a) adsorber la proteína en la proteína A inmovilizada en una fase sólida que comprende sílice o vidrio; (b) retirar los contaminantes unidos a la fase sólida lavando la fase sólida con un disolvente electrolítico hidrófobo; y (c) recuperar la proteína de la fase sólida.

40 En los documentos WO2011/038894 y WO2014/207763 se informa de procedimientos de cromatografía de proteína A con una disminución pronunciada de proteína y ADN de célula huésped por etapas de lavado específicas antes de la recuperación de la inmunoglobulina del material cromatográfico de proteína A.

45 En el documento WO2013/177118 se informa de composiciones y procedimientos para el aislamiento y purificación de anticuerpos de una matriz de muestra.

En el documento WO2013/033517 se informa de procedimientos para separar un polipéptido de interés (tal como un anticuerpo) de un virus.

50 Se informa de un procedimiento para purificar una proteína, incluyendo uno o más procedimientos cromatográficos, en el que un aminoácido; o un dipéptido, un oligopéptido o un poliaminoácido del mismo se incluye en una solución tampón usada en al menos un procedimiento cromatográfico (tampón de equilibrado, tampón de lavado y tampón de elución), purificando de este modo una proteína de pureza alta con una cantidad muy pequeña de la impureza (por ejemplo, polímeros o proteínas de célula huésped) en el documento EP2583973. En el documento
55 WO2015/038888 se informa de polipéptidos recombinantes purificados aislados de células huésped de ovario de hámster chino, incluyendo anticuerpos, tales como anticuerpos terapéuticos, y procedimientos de fabricación y uso de dichos polipéptidos. Se sometieron a prueba diferentes lavados en cromatografía de proteína A para determinar su capacidad para reducir proteínas de célula huésped, tales como PLBL2.

60 Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

65 En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo con contenido reducido de proteínas de célula huésped purificando el anticuerpo con una etapa de cromatografía de afinidad como se define por las reivindicaciones.

- 5 Con más detalle, se ha descubierto que por el procedimiento de la presente invención que usa una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de afinidad antes de la recuperación de un anticuerpo del material cromatográfico, que se puede reducir el contenido de determinadas proteínas de célula huésped en una solución que comprende el anticuerpo. En consecuencia, se ha descubierto que se puede reducir el contenido de fosfolipasas (en particular fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2)). Se ha descubierto que el contenido de PLBL2 se puede reducir 100 veces o más si el anticuerpo es del isotipo IgG4.
- 10 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de proteína A para reducir el contenido de una proteína de célula huésped en el que la cromatografía de proteína A se usa para purificar un anticuerpo de isotipo IgG1 humano o IgG4 humano, y la proteína de célula huésped es como se define por las reivindicaciones.
- 15 En un modo de realización de este aspecto, el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina, o un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X, o un anticuerpo frente a IL-13, o un anticuerpo frente a amiloide beta. En un modo de realización de este aspecto, el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.
- 20 En la presente invención, la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos.
- 25 En la presente invención, la proteína de célula huésped es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina.
- En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 8 mM.
- 30 En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 2 mM.
- En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7 o mayor.
- 35 En un modo de realización de este aspecto, la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja se precede o se sigue de una etapa de lavado con solución acuosa de conductividad alta.
- 40 En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de aproximadamente 20 mS/cm o mayor.
- En un modo de realización de este aspecto, se realiza una etapa de lavado intermedia con una solución acuosa de conductividad media entre la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja y la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad alta.
- 45 En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad media tiene un valor de conductividad de desde más de 0,5 mS/cm a menos de 20 mS/cm.
- 50 En un modo de realización de este aspecto, la solución acuosa de conductividad alta (o media) comprende histidina.
- Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano que comprende las etapas de
- 55 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,
- b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de la célula o del medio de cultivo,
- 60 c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un material de cromatografía de proteína A,
- d) lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,
- e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano del material de cromatografía de proteína A
- 65 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de una muestra que comprende las etapas de

- 5 a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,
- b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de proteína A, que comprende lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.
- 10

En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina o un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X o un anticuerpo frente a IL-13 o un anticuerpo frente a amiloide beta. En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.

15

En todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos.

20

En todos los aspectos, el contenido de una proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped (específica) es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina.

25

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 8 mM.

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 2 mM.

30

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7 o mayor.

En un modo de realización de todos los aspectos del procedimiento, el procedimiento comprende adicionalmente lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad alta y/o con una solución acuosa de conductividad media antes o después de lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja.

35

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de aproximadamente 20 mS/cm o mayor.

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad media tiene un valor de conductividad de desde más de 0,5 mS/cm a menos de 20 mS/cm.

40

En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad alta o media comprende histidina.

45

Descripción detallada de la invención

50

En el presente documento se informa de un procedimiento de cromatografía de afinidad mejorado y uso que comprende el lavado del material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja.

Se ha descubierto que se pueden reducir proteínas de célula huésped específicas con una etapa de lavado con una solución acuosa de conductividad baja, cuando esta etapa de lavado se usa en una etapa de cromatografía de afinidad, por ejemplo, una etapa de cromatografía de proteína A. La etapa de cromatografía de afinidad se usa en un procedimiento de purificación o producción para anticuerpos. La etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja es en particular eficaz para reducir el contenido de fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2).

55

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

60

En el presente documento se informa del uso de una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de afinidad para reducir el contenido de una proteína de célula huésped (específica).

En el presente documento se informa de un procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG humano que comprende

65

- a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de isotipo IgG humano,
- b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG humano de la célula o del medio de cultivo,
- c) poner en contacto (una solución que comprende) el anticuerpo de isotipo IgG humano con un material de cromatografía de afinidad,
- d) lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja, mientras que al menos un 90 % del anticuerpo biespecífico permanece unido al material de cromatografía de afinidad,
- e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG humano del material de cromatografía de afinidad
- y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG humano.

En el presente documento se informa de un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG humano a partir de una muestra que comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra (acuosa tamponada) que comprende un anticuerpo de isotipo IgG humano,
- b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja.

Los polipéptidos recombinantes producidos en células CHO se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento para retirar o reducir los niveles de proteínas de célula huésped.

Los polipéptidos recombinantes incluyen anticuerpos terapéuticos e inmunoadhesinas, incluyendo, sin limitación, anticuerpos, que incluyen fragmentos de anticuerpos, para uno o más de los siguientes antígenos: HER1 (EGFR), HER2 (por ejemplo, trastuzumab, pertuzumab), HER3, HER4, VEGF (por ejemplo, bevacizumab, ranibizumab), MET (por ejemplo, onartuzumab), CD20 (por ejemplo, rituximab, obinutuzumab, ocrelizumab), CD22, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4, VCAM, IL-17A y/o F, IgE (por ejemplo, omalizumab), DRS, CD40, Apo2L/TRAIL, EGFL7 (por ejemplo, parsatuzumab), NRP1, integrina beta7 (por ejemplo, etrolizumab), IL-13 (por ejemplo, lebrizumab), abeta (por ejemplo, crenezumab, gantenerumab), P-selectina (por ejemplo, inclacumab), IL-6R (por ejemplo, tocilizumab), IFN α (por ejemplo, rontalizumab), Mlprime (por ejemplo, quilizumab), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), OX40L, TSLP, factor D (por ejemplo, lampalizumab) y receptores tales como: receptor de IL-9, receptor de IL-5, receptor de IL-4 alfa, receptor de IL-13 alfa 1 y receptor de IL-13 alfa 2, OX40, TSLP-R, IL-7R alfa (un correceptor de TSLP), IL17RB (receptor para IL-25), ST2 (receptor para IL-33), CCR3, CCR4, CRTH2, Fc ϵ psilon RI y Fc ϵ psilon RII/CD23 (receptores para IgE). Otros anticuerpos incluyen los seleccionados de, y sin limitación, anticuerpo anti-receptor de estrógenos, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-E-cadherina, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-P-glucoproteína, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD 14, anticuerpo anti-CD 15, anticuerpo anti-CD 19, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD 100, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo anti-ubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anti-citoqueratinas, anticuerpo anti-vimentinas, anticuerpo anti-proteínas de VPH, anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa, anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda, anticuerpo anti-melanosomas, anticuerpo anti-antígeno prostático específico, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti-antígeno tau, anticuerpo anti-fibrina, anticuerpo anti-queratinas y anticuerpo anti-antígeno Tn.

Los anticuerpos divulgados incluyen anticuerpos para abeta, anticuerpos para IL17 A/F y anticuerpos para CMV. Se han descrito previamente anticuerpos anti-abeta ejemplares y procedimientos de producción de dichos anticuerpos, por ejemplo, en los documentos WO2008011348, WO2007068429, WO2001062801 y WO2004071408. Se han descrito previamente anticuerpos anti-IL17 A/F ejemplares y procedimientos de producción de dichos anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2009136286 y la patente de EE. UU. n.º 8.715.669. Se han descrito previamente anticuerpos anti-CMV ejemplares, incluyendo anti-CMV-MSL, y procedimientos de producción de dichos anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2012047732.

En un modo de realización de la invención, la cromatografía de afinidad se usa para purificar un anticuerpo IgG4. En un modo de realización, el anticuerpo de isotipo IgG4 es un anticuerpo frente a P-selectina o un anticuerpo (bienespecífico) frente a factor IXa y factor X o un anticuerpo frente a IL-13 o un anticuerpo frente a amiloide beta. En algunos modos de realización, la cromatografía de afinidad se usa para purificar un anticuerpo de isotipo IgG1. En un modo de realización, el anticuerpo de isotipo IgG1 es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente

a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo (bienespecifico) frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo bienespecifico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo bienespecifico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.

5 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para producir (una solución que contiene) un anticuerpo de isotipo IgG4 humano que comprende

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de isotipo IgG4 humano,

10 b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano de la célula o del medio de cultivo,

c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 humano con un material de cromatografía de afinidad,

15 d) lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja,

e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano del material de cromatografía de afinidad

y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 humano, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.

20 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para producir (una solución que contiene) un anticuerpo de isotipo IgG4 que comprende

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de isotipo IgG4,

25 b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 de la célula o del medio de cultivo,

c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 con un material de cromatografía de afinidad,

30 d) lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja,

e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 del material de cromatografía de afinidad

35 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 humano de una muestra que comprende las etapas de

40 a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 humano,

b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.

45 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 de una muestra que comprende las etapas de

50 a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4,

b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad baja, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped se define en las reivindicaciones.

55 Se ha descubierto que el contenido de una proteína de célula huésped se puede reducir si la conductividad de la solución acuosa usada en la etapa de lavado es baja, es decir, se usa una solución acuosa de conductividad baja para el lavado. En todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de desde aproximadamente 0,03 μ S/cm a aproximadamente 0,5 mS/cm. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de desde aproximadamente 0,05 μ S/cm a aproximadamente 0,35 mS/cm. En un modo de realización de todos los aspectos, la solución acuosa de conductividad baja es agua desionizada. Para algunas aplicaciones, el agua desionizada no es adecuada para usarse en una etapa de lavado. En algunos modos de realización, la solución acuosa de conductividad baja no es agua desionizada.

65

5 Se ha descubierto que se puede usar una cromatografía de afinidad de proteína A para los propósitos informados en el presente documento. En todos los aspectos, la cromatografía de afinidad es una cromatografía de afinidad de proteína A. En un modo de realización, la cromatografía de afinidad de proteína A se selecciona del grupo que comprende cromatografía de afinidad MabSelectSure, cromatografía de afinidad ProSep vA, cromatografía de afinidad Poros Mab Capture A, cromatografía de afinidad ProSep Ultra Plus, MabSelect SuRe LX, MabSelect, Eshmuno A, Toyopearl AF-rProtein A-650F; Toyopearl AF-rProtein A HC-650HF). En un modo de realización, la cromatografía de afinidad comprende una proteína A mutada acoplada a una matriz de cromatografía o un fragmento de proteína A acoplada a una matriz de cromatografía.

10 Se ha descubierto que se puede reducir el contenido de proteínas de célula huésped (específicas). Se ha descubierto que se puede reducir en especial el contenido de fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2). En un modo de realización, la proteína de célula huésped (específica) es una proteína de célula huésped de ovario de hámster chino (CHO). En todos los aspectos, la proteína de célula huésped (específica) es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina. En un modo de realización, la proteína de célula huésped (específica) es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2).

15 Se ha descubierto que la solución acuosa de conductividad baja puede comprender determinadas sustancias tamponantes, por ejemplo, Tris o fosfato de potasio en cantidades bajas. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja contiene tris(hidroximetil)aminometano (Tris). En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 6,5 mM. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris aproximadamente 2 mM. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja contiene fosfato de potasio. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 5 mM. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 2 mM. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio aproximadamente 0,5 mM.

20 Se ha descubierto que el efecto de reducir el contenido de una proteína de célula huésped se pronuncia si la solución acuosa de conductividad baja tiene un determinado pH. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7 o mayor. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7,5 o mayor. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de desde aproximadamente 7 a aproximadamente 9,5. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de desde aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 8. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 9.

30 Se ha descubierto que el efecto de reducir el contenido de una proteína de célula huésped también se puede lograr si el pH de la solución acuosa de conductividad baja es de aproximadamente 8,5 o mayor y la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 1,2 mS/cm o menos. La solución de conductividad baja usada en la invención se define en las reivindicaciones. También se divulga un procedimiento o uso en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 8,5 o mayor y la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 1,2 mS/cm o menos. Por ejemplo, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 8,5 o mayor y la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 1 mS/cm o menos. Por ejemplo, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 8,5 o mayor y la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris aproximadamente 55 mM o menos. Por ejemplo, la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 8,5 o mayor y la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris aproximadamente 30 mM o menos.

35 En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad baja está en el intervalo de pH de desde pH 7 a menos de pH 8,5 y tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm. También se divulga una solución a un valor de pH de 8,5 o más, un valor de conductividad de aproximadamente 1,2 mS/cm o menos.

40 Se ha descubierto que por los usos y los procedimientos como se informa en el presente documento, se puede reducir el contenido de proteínas de célula huésped como PLBL2 a un determinado nivel, por ejemplo, en comparación con la cantidad de carga de PLBL2 antes de una etapa de purificación como una etapa de cromatografía de afinidad. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 20 veces. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 40 veces. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 50 veces. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 90 veces. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 100 veces. En algunos casos, el nivel de reducción es incluso mayor. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 200 veces. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 250 veces. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 300 veces. En algunos modos de realización, el

- contenido de PLBL2 se reduce al menos 400 veces. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos 1000 veces. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos en un 50 %. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos en un 66 %. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos en un 80 %. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos en un 90 %. En un modo de realización, el contenido de PLBL2 se reduce al menos en un 95 %. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce por debajo de 10 ng por mg de anticuerpo. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce por debajo de 5 ng por mg de anticuerpo. En algunos modos de realización, el contenido de PLBL2 se reduce por debajo de 2 ng por mg de anticuerpo.
- En los procedimientos y los usos como se informa en el presente documento se pueden emplear otras etapas de lavado con soluciones acuosas de conductividad media y/o alta. En un modo de realización, la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja se precede o se sigue de una etapa de lavado con solución acuosa de conductividad alta. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de aproximadamente 20 mS/cm o mayor. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de desde aproximadamente 20 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. En un modo de realización, se realiza una etapa de lavado intermedia con una solución acuosa de conductividad media entre la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja y la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad alta. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad media tiene un valor de conductividad de desde más de 0,5 mS/cm a menos de 20 mS/cm.
- Se ha descubierto que el efecto reductor de proteína de célula huésped se puede mejorar cuando la solución acuosa de conductividad alta o media comprende además un aminoácido. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta o media comprende un aminoácido. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta o media comprende histidina o arginina. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta o media comprende histidina. En un modo de realización, la solución acuosa de conductividad alta o media comprende histidina y Tris.
- Los procedimientos y los usos como se informa en el presente documento pueden incluir una o más de otras etapas de cromatografía. En un modo de realización, se realiza al menos un procedimiento/etapa de cromatografía adicional. En un modo de realización, se realiza un procedimiento/etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional. En un modo de realización, se realiza un procedimiento/etapa de cromatografía de intercambio aniónico adicional. En un modo de realización, se realizan un procedimiento/etapa de cromatografía de intercambio aniónico adicional y un procedimiento/etapa de cromatografía de intercambio catiónico adicional.
- Se ha descubierto que se puede omitir el uso de una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba. En un modo de realización, el uso o los procedimientos es sin un procedimiento/etapa de cromatografía de interacción hidrófoba.
- Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de proteína A para reducir el contenido de PLBL2 o clusterina en el que la cromatografía de proteína A se usa para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1, por ejemplo, una IgG4 o IgG1 humana, y en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor.
- Un aspecto es el uso de una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de proteína A para reducir el contenido de PLBL2 o clusterina en el que la cromatografía de proteína A se usa para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano, y en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG4, por ejemplo, un anticuerpo frente a P-selectina, o un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X, o un anticuerpo frente a IL-13, o un anticuerpo frente a amiloide beta. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1, por ejemplo, un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a beta amiloide, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.
- En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano que comprende
- cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,
 - recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de la célula o del medio de cultivo,
 - poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un material de cromatografía de afinidad de proteína A,

d) lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano del material de cromatografía de afinidad

5 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,

en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones.

10

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano que comprende

15 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,

b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de la célula o del medio de cultivo,

20 c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un material de cromatografía de afinidad de proteína A,

20

d) lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano del material de cromatografía de afinidad

25 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,

en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones,

30

y en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina, o un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X, o un anticuerpo frente a IL-13, o un anticuerpo frente a amiloide beta y en el que el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.

35

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de una muestra que comprende las etapas de

40

a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,

45 b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad de proteína A, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

45

en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones.

50

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de una muestra que comprende las etapas de

55 a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,

55

b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad de proteína A, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

60

en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones,

65

y en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina, o un anticuerpo frente a factor IXa y factor X, o un anticuerpo frente a IL-13, o un anticuerpo frente a amiloide beta y en el que el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente

a CD22, o un anticuerpo frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.

5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG4 humano que comprende

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de isotipo IgG4 humano,

10 b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano de la célula o del medio de cultivo,

c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 humano con un material de cromatografía de afinidad de proteína A,

15 d) lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano del material de cromatografía de afinidad

20 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 humano,

en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones,

25 y en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a factor IXa y factor X.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 humano de una muestra que comprende las etapas de

30 a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 humano,

b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de afinidad de proteína A, que comprende lavar el material de cromatografía de afinidad de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja,

35 en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos y un pH de aproximadamente 7 o mayor, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y la proteína de célula huésped es como se define en las reivindicaciones,

40 y en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a factor IXa y factor X.

Los términos "anticuerpo anti-P-selectina" y "un anticuerpo que se une a P-selectina" o "anticuerpo frente a P-selectina" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a P-selectina con afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para seleccionar la P-selectina. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-P-selectina a una proteína distinta de P-selectina no relacionada es menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a P-selectina como se mide, por ejemplo, por ELISA o resonancia de plasmón superficial. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-P-selectina se une a un epítipo de P-selectina que se conserva entre P-selectina de diferentes especies. Lo anterior también es válido para los términos "anticuerpo frente a factor IXa y factor X" o "anticuerpo frente a IL-13" o "anticuerpo frente a amiloide beta" o similares.

En algunos modos de realización, el anticuerpo frente a P-selectina es inclacumab (isotipo IgG4) como se describe en el documento WO 2005/100402 o SEQ ID NO: 07 a 12. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X, por ejemplo, un anticuerpo anti-FIXa/X (isotipo IgG4) como se describe en el documento WO 2012/067176. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo frente a Her2, por ejemplo, trastuzumab (isotipo IgG1) como se describe en el documento WO 1992/022653. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico frente a angiopoyetina 2 (Ang2) y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), por ejemplo, vanucizumab (isotipo IgG1) como se describe en el documento WO 2011/117329 o SEQ ID NO: 01 a 04. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo frente a amiloide beta, por ejemplo, gantenerumab (isotipo IgG1) como se describe en el documento WO 2003/070760 o SEQ ID NO: 05 a 06, o crenezumab (isotipo IgG4). En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo frente a CD22, un anticuerpo frente a IL13 (por ejemplo, lebrizumab), un anticuerpo biespecífico frente a Her3 y EGFR (por ejemplo, duligotuzumab), un anticuerpo frente a VEGF-A (por ejemplo, bevacizumab) y un anticuerpo frente a gripe B. Los términos VEGF o VEGF-A se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (RPS, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_d (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a). Unir o unir específicamente quiere decir una afinidad de unión (K_D) de 10^{-7} mol/l o menos.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocaténario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento Fab es un fragmento de anticuerpo obtenido por una digestión con papaína de un anticuerpo (de longitud completa/completo).

"Anticuerpos biespecíficos" son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. El término anticuerpo "biespecífico" como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene al menos dos sitios de unión, de los que cada uno se une a epítopos diferentes.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "anticuerpo de isotipo IgG humano" indica un anticuerpo que comprende una región constante que se deriva de un isotipo IgG natural humano, es decir, por ejemplo, puede comprender una región constante derivada de un isotipo IgG humano con una mutación, por ejemplo, una mutación P329G (numeración de acuerdo con Kabat).

El término "anticuerpo de isotipo IgG4 humano" indica un anticuerpo que comprende una región constante que se deriva de un isotipo IgG4 natural humano, es decir, por ejemplo, puede comprender una región constante derivada de un isotipo IgG4 humano con una mutación, por ejemplo una mutación P329G y/o mutación S228P, L235E (numeración de acuerdo con Kabat).

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) o el dipéptido de glicil-lisina C terminal (Gly446Lys447) de la región Fc pueden estar o no presentes. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. El término "célula" incluye células que se usan para la expresión de ácidos nucleicos. En un modo de realización, la célula huésped es una célula CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DG44), o una célula BHK, o una

célula NS0, o una célula SP2/0, o una célula HEK 293, o una célula HEK 293 EBNA, o una célula PER.C6® o una célula COS. En otro modo de realización, la célula es una célula CHO, una célula BHK o una célula PER.C6®. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula" incluye la célula en cuestión y su descendencia.

5 El término "lavado" indica la aplicación de una solución a un material de cromatografía de afinidad para retirar polipéptidos y compuestos no polipeptídicos no unidos específicamente del material de cromatografía, en especial para retirar proteína de célula huésped y ADN de célula huésped. El término "lavado" no engloba la elución del material unido de un material de cromatografía de afinidad.

10 Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de afinidad con una proteína recombinante como ligando (por ejemplo, Fv monocatenario como ligando, por ejemplo, Kappa Select), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio mixto),
 15 adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar). Estos procedimientos se pueden combinar independientemente en diferentes modos
 20 de realización como se informa en el presente documento.

El término "proteína A" indica un polipéptido de proteína A obtenido de una fuente natural o bien producido sintéticamente.

25 El término "material de cromatografía de proteína A" indica una fase sólida inerte a la que se une covalentemente una proteína A.

En un modo de realización, el material de cromatografía de proteína A se selecciona de MabSelectSure, ProSep vA, Mab Capture A, ProSep Ultra Plus, Mab Select, Mab Select Xtra, Poros A o ProSep A.

30 El término "solución acuosa de conductividad alta" indica una solución acuosa con un valor de conductividad alto. El valor de conductividad puede ser de aproximadamente 20 mS/cm o mayor.

35 El término "solución acuosa de conductividad media" indica una solución acuosa con un valor de conductividad medio. El valor de conductividad puede ser de más de 0,5 mS/cm a menos de 20 mS/cm.

40 El término "solución acuosa de conductividad baja" indica una solución acuosa con un valor de conductividad bajo. El valor de conductividad puede ser de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos. Los valores de conductividad se pueden determinar por procedimientos estándar conocidos para el experto en la técnica.

Los siguientes ejemplos y secuencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, de la que su verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado de secuencias

- 45
- SEQ ID NO: 01** dominio variable de la cadena pesada VH de <VEGF>
 - SEQ ID NO: 02** dominio variable de la cadena ligera VL de <VEGF>
 - SEQ ID NO: 03** dominio variable de la cadena pesada VH de <ANG-2>
 - SEQ ID NO: 04** dominio variable de la cadena ligera VL de <ANG-2>
 - SEQ ID NO: 05** dominio variable de la cadena pesada VH del anticuerpo anti-amiloide beta (isotipo IgG1)
 - SEQ ID NO: 06** dominio variable de la cadena ligera VL del anticuerpo anti-amiloide beta (isotipo IgG1)
 - SEQ ID NO: 07** dominio variable de la cadena pesada VH1 del anticuerpo anti-P-selectina
 - SEQ ID NO: 08** dominio variable de la cadena pesada VH2 del anticuerpo anti-P-selectina
 - SEQ ID NO: 09** dominio variable de la cadena pesada VH3 del anticuerpo anti-P-selectina
 - SEQ ID NO: 10** dominio variable de la cadena ligera VL1 del anticuerpo anti-P-selectina
 - SEQ ID NO: 11** dominio variable de la cadena ligera VL2 del anticuerpo anti-P-selectina
 - SEQ ID NO: 12** dominio variable de la cadena ligera VL3 del anticuerpo anti-P-selectina

Ejemplo 1**Material y procedimientos****5 Anticuerpos**

La presente invención se ejemplifica usando varios anticuerpos ejemplares, incluyendo: un anticuerpo frente a P-selectina (anticuerpo anti-P-selectina; inclacumab; isotipo IgG4) como se describe en el documento WO 2005/100402 o de SEQ ID NO: 07 a SEQ ID NO: 12; un anticuerpo biespecífico frente a factor IXa y factor X (anticuerpo anti-FIXa/X; isotipo IgG4) como se describe en el documento WO 2012/067176; con un anticuerpo frente a Her2; un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A (anticuerpo anti-Ang2/VEGF-A; vanucizumab; isotipo IgG1) como se describe en el documento WO 2011/117329 o de SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 04; un anticuerpo frente a amiloide beta (anticuerpo anti-amiloide beta; gantenerumab; isotipo IgG1) como se describe en el documento WO 2003/070760 o de SEQ ID NO: 05 a SEQ ID NO: 06. También se incluyen en el presente documento varios anticuerpos de IgG1 y anticuerpos de IgG4, como se describe en los ejemplos a continuación.

Procedimientos de detección para proteína de célula huésped (HCP), proteína fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) y clusterina generales**20 a) Ensayo HCP CHO**

El contenido de HCP CHO residual en las muestras de procedimiento se determina por un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el analizador de inmunoanálisis cobas e 411 (Roche Diagnostics).

25 El ensayo se basa en un principio de sándwich que usa anticuerpo anti-HCP CHO policlonal de oveja.

Primera incubación: la proteína de célula huésped de ovario de hámster chino (HCP CHO) de una muestra de 15 µl (sin diluir y/o diluida) y un anticuerpo específico de HCP CHO policlonal conjugado con biotina forman un complejo de tipo sándwich, que se une a micropartículas recubiertas de estreptavidina por medio de interacción de biotina con estreptavidina.

Segunda incubación: después de la adición de anticuerpo específico de HCP CHO policlonal marcado con complejo de rutenio (complejo Tris(2,2-bipiridil)rutenio(II)) se forma un complejo de tipo sándwich ternario sobre las micropartículas.

35 La mezcla de reacción se aspira a la celda de medición donde las micropartículas se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo. A continuación, se retiran sustancias no unidas en una etapa de lavado. La aplicación de un voltaje al electrodo induce a continuación emisión quimioluminiscente que se mide por un fotomultiplicador.

40 La concentración de HCP CHO en la muestra de prueba se calcula finalmente a partir de una curva estándar de HCP CHO de concentración conocida.

45 b) Ensayo PLBL2 CHO

El contenido de proteína fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) de ovario de hámster chino (CHO) residual en muestras de procedimiento se determina por un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el analizador de inmunoanálisis cobas e 411 (Roche Diagnostics).

50 El ensayo se basa en un principio de sándwich que usa anticuerpo anti-PLBL2 CHO monoclonal de ratón.

En una primera etapa de incubación, PLBL2 CHO de una muestra de 30 µl (sin diluir y/o diluida), anticuerpo específico de PLBL2 CHO monoclonal marcado con biotina y un anticuerpo específico de PLBL2 CHO monoclonal marcado con un complejo de rutenio (complejo Tris(2,2-bipiridil)rutenio(II)) forman un complejo de tipo sándwich.

55 En una segunda etapa después de la adición de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo ternario se une a la fase sólida por medio de interacción de biotina y estreptavidina.

60 La mezcla de reacción se aspira a la celda de medición donde las micropartículas se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo. A continuación, se retiran sustancias no unidas en una etapa de lavado. La aplicación de un voltaje al electrodo induce a continuación quimioluminiscencia que se mide por un fotomultiplicador.

65 La concentración de PLBL2 CHO en la muestra de prueba se calcula finalmente a partir de una curva estándar de PLBL2 CHO de concentración conocida.

c) Ensayo de clusterina

El contenido en clusterina residual en las muestras de procedimiento se determina por un ensayo comercial de Merck Millipore (GyroMark HT Kit GYRCLU-37K) que se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5

En resumen, este ensayo es un ELISA de tipo sándwich basado, secuencialmente, en:

1) unión del anticuerpo de captura biotinilado de clusterina de rata a las columnas de afinidad recubiertas de estreptavidina del Bioaffy CD de 1000 nl,

10

2) captura de moléculas de clusterina de rata de muestras al anticuerpo anti-clusterina,

3) unión de un segundo anticuerpo de detección anti-clusterina marcado con tinte a las moléculas capturadas,

15

4) cuantificación de la clusterina de rata usando el evaluador Gyrolab.

Ejemplo 2

Purificación de un anticuerpo anti-P-selectina (isotipo IgG4) en una cromatografía de proteína A

20

Anticuerpo: anti-P-selectina

Condiciones de cromatografía generales

25

Resina de columna: material de proteína A "Mab Select SuRe" (GE-Healthcare) Ø 1 cm, altura: 20,1 cm, VC: 15,79 ml

Equipo: Äkta Avant 150

30

Caudal: 300 cm/h durante todas las etapas

Se aplicó una solución que contiene un anticuerpo anti-P-selectina a una columna de afinidad de proteína A después del equilibrado (etapa 1) de la columna. Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-P-selectina: 335 ng PLBL2/mg de anticuerpo. Carga inicial de clusterina determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-P-selectina: 2874,8 ng clusterina/mg de anticuerpo. Carga inicial de CHOP determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-P-selectina: 100971 ng CHOP/mg de anticuerpo.

35

Las etapas cromatográficas se realizaron de acuerdo con el siguiente esquema general:

40

Etapa 1: equilibrado:

Etapa 2: carga de solución que contiene anticuerpo

Etapa 3: lavado I

45

Etapa 4: lavado II

Etapa 5: lavado III

50

Etapa 6: lavado IV (lavado adicional)

Etapa 7: elución

55

Después de la elución de la columna de afinidad de proteína A, la proteína se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y análisis espectrofotométrico (DO).

SEC:

Resina:	TSK 3000 (Tosoh)
Columna:	300 x 7,8 mm
Caudal:	0,5 ml/min
Tampón:	fosfato de potasio 200 mM, que contiene cloruro de potasio 250 mM, ajustado a pH 7,0

ES 2 877 532 T3

Longitud de onda: 280 nm

DO:

Coefficiente específico: 1,54

Longitud de onda: 280 nm menos 320 nm

5 Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A (anticuerpo anti-P-selectina)

a) Control (solo lavado con tampón de equilibrado)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	---
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	---
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

10 b) lavado de conductividad baja (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

c) lavado de conductividad baja (solo con fosfato de potasio (KP))

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	fosfato de potasio 0,5 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

15

d) lavado de conductividad alta (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 700 mM, pH 7,2
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	---

ES 2 877 532 T3

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

e) lavado de conductividad baja (solo con tampón Tris; pH 6,0)

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 4: lavado II: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 6,0

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

5 f) lavado de conductividad alta (solo con tampón de histidina (His)/Tris)

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0

Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 6: lavado IV: ---

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

g) Tris de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0

Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 8,0

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

10

h) fosfato de potasio (KP) de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0

Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 6: lavado IV: fosfato de potasio 0,5 mM, pH 8,0

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

i) Tris de conductividad baja + Tris de conductividad alta

15

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

ES 2 877 532 T3

Etapa 4: lavado II:	Tris 700 mM, pH 7,2
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

j) Tris de conductividad baja; pH 6,0 + Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 700 mM, pH 7,2
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	Tris 2 mM, pH 6,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

5 Resultados:

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	218	105,9	27,4	93,44
b	105	0,8	11,2	94,61
c	114	0,7	11,8	86,67
d	48	14,7	23,2	89,33
e	155	18,7	53,8	107,3
f	106	2,9	21,6	84,9
g	83	0,4	11,8	85
h	91	0,4	9,1	80,34
i	90	0,4	15,7	84,92
j	141	1,5	53	106,9

Ejemplo 3

10 Purificación de un anticuerpo anti-amiloide beta (isotipo IgG1) en una cromatografía de proteína A

Las condiciones generales fueron de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 2.

Anticuerpo: anti-amiloide beta.

15

Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-amiloide beta: 2019,7 ng PLBL2/mg de anticuerpo. Carga inicial de CHOP determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-amiloide beta: 578908 ng CHOP/mg de anticuerpo.

20 Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A

a) Control (solo lavado con tampón de equilibrado)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

ES 2 877 532 T3

Etapa 5: lavado III: ---
 Etapa 6: lavado IV: ---
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

b) lavado de conductividad baja (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

5 c) lavado de conductividad alta (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: Tris 700 mM, pH 7,2
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: ---
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

d) Tris de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

10

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	6828	17,3	n.d.	80,3
b	7794	17,8	n.d.	73,1
c	1595	1,7	n.d.	55,6
d	6132	2,3	n.d.	67,3

Ejemplo 4

Purificación de un anticuerpo anti-Her2 (isotipo IgG1) en una cromatografía de proteína A

15

Las condiciones generales fueron de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 2.

Anticuerpo: anti-Her2

ES 2 877 532 T3

Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-Her2: 1662,5 ng PLBL2/mg de anticuerpo. Carga inicial de CHOP determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-Her2: 727070 ng CHOP/mg de anticuerpo.

5

Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A

a) Control (solo lavado con tampón de equilibrado)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	---
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	---
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

10

b) lavado de conductividad baja (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

15

c) lavado de conductividad alta (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 700 mM, pH 7,2
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	---
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

d) Tris de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
<i>Etapa 6: lavado IV:</i>	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	309	1,2	n.d.	85,5
b	227	1	n.d.	77
c	26	0,2	n.d.	70,9
d	42	0,5	n.d.	83,8

Ejemplo 5

5 Purificación de un anticuerpo anti-Ang2/VEGF-A biespecífico (isotipo IgG1) en una cromatografía de proteína A

Las condiciones generales fueron de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 2.

Anticuerpo: anti-Ang2/VEGF-A

10

Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-Ang2/VEGF-A biespecífico: 919,7 ng PLBL2/mg de anticuerpo. Carga inicial de CHOP determinada en solución que contiene un anti-Ang2/VEGF-A: 682304 ng CHOP/mg de anticuerpo.

15

Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A

a) Control (solo lavado con tampón de equilibrado)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	---
Etapa 6: lavado IV:	---
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

20

b) lavado de conductividad baja (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 6: lavado IV:	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 7: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

c) lavado de conductividad alta (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 4: lavado II:	Tris 700 mM, pH 7,2
Etapa 5: lavado III:	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
Etapa 6: lavado IV:	---

Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

d) Tris de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	3035	1,0	n.d.	85,0
b	1707	0,8	n.d.	79,8
c	655	0,7	n.d.	52
d	1050	0,8	n.d.	92,3

5

Ejemplo 6

Purificación de un anticuerpo anti-FIXa/X biespecifico (isotipo IgG4) en una cromatografía de proteína A

10 La purificación del anticuerpo anti-FIXa/X se sometió a prueba en dos configuraciones de cromatografía diferentes:

Configuración 1

15 Las condiciones generales fueron de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 2.

15

Anticuerpo: anti-FIXa/X

20

Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-FIXa/X: 557 ng PLBL2/mg de anticuerpo. Carga inicial de CHOP determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-FIXa/X: 387377 ng CHOP/mg de anticuerpo.

Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A

25

a) lavado de conductividad alta (solo con tampón Tris)

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: Tris 700 mM, pH 7,2
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: ---
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

b) Tris de conductividad baja + histidina (His)/Tris de conductividad alta

Etapa 1: equilibrado: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0

Etapa 4: lavado II: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0
 Etapa 5: lavado III: Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0
 Etapa 6: lavado IV: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 7: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	1632	19,1	n.d.	79
b	2148	1,1	n.d.	77

Configuración 2

5 Condiciones de cromatografía generales

Resina de columna: material de proteína A "Mab Select SuRe" (GE-Healthcare) Ø 1 cm, altura: 20,1 cm, VC: 15,79 ml

10 Equipo: Äkta Avant 150

Caudal: 300 cm/h durante todas las etapas

15 Se aplicó una solución que contiene un anticuerpo anti-FIXa/X, a una columna de afinidad de proteína A después del equilibrado (etapa 1) de la columna.

Carga inicial de PLBL2 determinada en solución que contiene un anticuerpo anti-FIXa/X: 557 ng PLBL2/mg de anticuerpo.

20 Las etapas cromatográficas se realizaron de acuerdo con el siguiente esquema general:

Etapa 1: equilibrado:

Etapa 2: carga de solución que contiene anticuerpo

25 Etapa 3: lavado I

Etapa 4: lavado II

30 Etapa 5: lavado III (lavado adicional)

Etapa 6: elución

Condiciones de tampón específicas para cromatografía de proteína A

35 a) lavado de conductividad alta (solo con tampón de NaSO₄)

Etapa 1: equilibrado: NaPO₄ 20 mM, pH 7,5

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: NaSO₄ 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8

Etapa 4: lavado II: NaPO₄ 20 mM, pH 7,5

Etapa 5: lavado III: ---

Etapa 6: elución: ácido acético 35 mM, pH 4,0

40 b) lavado de conductividad baja (Tris 1 mM) + lavado de conductividad alta (con NaSO₄)

Etapa 1: equilibrado: NaPO₄ 20 mM, pH 7,5

Etapa 2: carga

Etapa 3: lavado I: NaSO₄ 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8

ES 2 877 532 T3

Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 1 mM, pH 8,0
Etapa 6: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

c) lavado de conductividad baja (Tris 2 mM) + lavado de conductividad alta (con NaSO4)

Etapa 1: equilibrado:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	NaSO4 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8
Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 2 mM, pH 8,0
Etapa 6: elución:	ácido acético 35 mM, pH 4,0

5 d) lavado de conductividad baja (Tris 4 mM) + lavado de conductividad alta (con NaSO4)

Etapa 1: equilibrado:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	NaSO4 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8
Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 4 mM, pH 8,0
Etapa 6: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

e) lavado de conductividad baja (Tris 6 mM) + lavado de conductividad alta (con NaSO4)

Etapa 1: equilibrado:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	NaSO4 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8
Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 6 mM, pH 8,0
Etapa 6: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

10

f) lavado de conductividad baja (Tris 4 mM, pH 7,8) + lavado de conductividad alta (con NaSO4)

Etapa 1: equilibrado:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	NaSO4 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8
Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 4 mM, pH 7,8
Etapa 6: elución:	ácido acético 50 mM, pH 4,0

15

g) lavado de conductividad baja (Tris 4 mM, pH 8,2) + lavado de conductividad alta (con NaSO4)

Etapa 1: equilibrado:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
Etapa 2: carga	
Etapa 3: lavado I:	NaSO4 450 mM, NaAc 20 mM, pH 4,8
Etapa 4: lavado II:	NaPO4 20 mM, pH 7,5
<i>Etapa 5: lavado III:</i>	Tris 4 mM, pH 8,2

ES 2 877 532 T3

Etapa 6: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

h) lavado de conductividad baja (Tris 2 mM) + lavado de conductividad alta (con histidina (His)/Tris 1 M)

Etapa 1: equilibrado: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: His 200 mM/Tris 1000 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 5: lavado III: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 6: elución: ácido acético 35 mM, pH 4,0

5 i) lavado de conductividad baja (Tris 2 mM) + lavado de conductividad alta (histidina (His)/Tris 0,85 M)

Etapa 1: equilibrado: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: His 200 mM/Tris 850 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 5: lavado III: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 6: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

j) lavado de conductividad baja (Tris 2 mM) + lavado de conductividad alta (histidina (His)/Tris 0,7 M)

Etapa 1: equilibrado: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: His 200 mM/Tris 700 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 5: lavado III: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 6: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

10

k) lavado de conductividad baja (Tris 2 mM) + lavado de conductividad alta (histidina (His)/Tris 0,55 M)

Etapa 1: equilibrado: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 2: carga
 Etapa 3: lavado I: His 200 mM/Tris 550 mM, pH 7,0
 Etapa 4: lavado II: NaPO4 20 mM, pH 7,5
 Etapa 5: lavado III: Tris 2 mM, pH 8,0
 Etapa 6: elución: ácido acético 50 mM, pH 4,0

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
a	1518	204,2	n.d.	82
b	646	1	n.d.	73,8
c	737	1,2	n.d.	79
d	595	1,4	n.d.	78,5
e	685	1,8	n.d.	79,5
f	692	1,4	n.d.	78,2

Ciclo	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]	Clusterina [ng/mg]	Rendimiento [%]
g	707	1,1	n.d.	76,4
h	299	0,5	n.d.	79
i	140	0,4	n.d.	70
j	100	0,5	n.d.	71,9
k	112	0,7	n.d.	73

Ejemplo 7

Procedimiento general/condiciones:

5

Líquido de cultivo celular simulado

Se produjo líquido de cultivo celular recogido nulo usando células CHO-DP12 no transfectadas cultivadas en medio sin suero. La fermentación se realizó a escala de 2 l usando un procedimiento de cultivo celular representativo. Al final de los 14 días de fermentación, se recogió el líquido de cultivo celular por medio de centrifugación y filtración estéril. Este líquido de cultivo celular recogido (HCCF) se almacenó a continuación a -70 °C hasta la experimentación.

10

PLBL2 purificada

15

Se expresó PLBL2 CHO recombinante con una marca hexahistidina C terminal en transfecciones transitorias a escala de 35 l y se purificó del líquido de cultivo celular recogido como se describe previamente (Vanderlaan *et al.*, 2015). A continuación, se formuló PLBL2 purificada en una solución de PBS y se almacenó a -70 °C hasta la experimentación.

20

Anticuerpo purificado

Se expresaron anticuerpos humanizados recombinantes en células CHO y se purificaron usando cromatografía en columna para garantizar que la concentración de PLBL2 era inferior a 20 ng/mg. Antes de comenzar cada estudio, se intercambió el tampón a PBS de cada anticuerpo usando columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare).

25

Preparación de material de carga para cromatografía de proteína A

Para normalizar la población y abundancia de proteínas de célula huésped en la carga de proteína A para todos los anticuerpos, los anticuerpos purificados se diluyeron a la misma concentración con PBS y se echaron en HCCF de una línea celular no productora para dar una valoración de anticuerpo final de 5 g/l. También se preparó un control en el que se añadió PBS en lugar del anticuerpo purificado para evaluar la unión de proteína de célula huésped inespecífica a la resina de proteína A en ausencia de anticuerpo.

30

Cromatografía en columna de lecho relleno

Todos los experimentos de cromatografía en columna de lecho relleno se realizaron usando una columna de resina de proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare) de 0,66 cm de diámetro interno por 20 cm de altura de lecho. Para cada purificación, la columna se equilibró en primer lugar para 3 volúmenes de columna (VC) con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,7 (tampón de equilibrado). A continuación se aplicó la carga de proteína A a una densidad de carga objetivo de 30 g de anticuerpo/l de resina, después de esto se lavó la columna para 3 VC con tampón de equilibrado, 3 VC de diferentes tipos de tampones de lavado y de nuevo con 3 VC de tampón de equilibrado. Posteriormente, se eluyó el anticuerpo a pH bajo con ácido acético de 0,1 a 0,15 M, y se recogieron los grupos de eluido comenzando a DO 0,5 al comienzo del pico de elución; la agrupación finalizó después de 2,8 VC. Para el ciclo de control con HCCF nulo enriquecido con PBS, se generó un grupo de elución simulada de 2,8 VC comenzando a partir de 1 VC a 3,8 VC después del inicio de la fase de elución. Al final de cada ciclo, cada eluido de proteína A se valoró a continuación hasta pH 5,0 usando base Tris 1,5 M. A continuación se limpió la columna con una solución de hidróxido de sodio 0,1 M. Todas las fases tuvieron un caudal volumétrico de 20 VC/h excepto las fases de carga, primer lavado de equilibrado y elución, que tuvieron un caudal de 15 VC/h.

40

45

50

A) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG4), anticuerpo A, en una cromatografía de proteína A

Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo A (isotipo IgG4) usando el procedimiento general del ejemplo 7 (como se explica anteriormente):

55

a) fosfato de potasio 0,4 M, pH 7,0

b) Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,7

5 c) Arg-HCl 0,75 M, pH 7,0

d) NaCl 0,6 M, pH 7,0

e) agua desionizada

10

Resultados:

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 1067817	Carga: 7668
a	1434	167
b	1440	107
c	331	40
d	1864	66
e	1204	31

15 B) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG1), anticuerpo B, en una cromatografía de proteína A

15

Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo B (isotipo IgG1) usando el procedimiento general del ejemplo 7:

a) agua desionizada

20

Resultados:

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 1067817	Carga: 7668
a	2630	71

25 C) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG4), anticuerpo C, en una cromatografía de proteína A

25

Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo C (isotipo IgG4) usando el procedimiento general del ejemplo 7:

a) fosfato de potasio 0,4 M, pH 7,0

30

b) Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,7

c) Arg-HCl 0,75 M, pH 7,0

35

d) NaCl 0,6 M, pH 7,0

e) agua desionizada

Resultados:

40

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 1067817	Carga: 7668
a	314	434
b	361	369
c	214	82
d	780	214

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 1067817	Carga: 7668
e	410	68

D) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG1), anticuerpo D, en una cromatografía de proteína A

5 Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo D (isotipo IgG1) usando el procedimiento general del ejemplo 7:

a) agua desionizada

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 1067817	Carga: 7668
a	6427	28

10 E) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG1), anticuerpo E, en una cromatografía de proteína A

Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo E (isotipo IgG1) usando el procedimiento general del ejemplo 7:

15 a) fosfato de potasio 0,4 M, pH 7,0

b) Tris 31 mM, pH 8,5

20 c) Tris 55 mM, pH 9,0

d) agua desionizada

Resultados:

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 169706	Carga: 333
a	1307	36
b	884	7
c	601	0,2
d	929	8

25 F) Purificación de un anticuerpo ejemplar (isotipo IgG1), anticuerpo F, en una cromatografía de proteína A

Condiciones de tampón de lavado específicas para la purificación del anticuerpo F usando el procedimiento general del ejemplo 7:

30 a) Tris 25 mM, pH 9,0

Resultados:

	HCP total [ng/mg]	PLBL2 [ng/mg]
	Carga: 994582	Carga: 1363
a	806	0,5

35

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
Genentech, Inc.
- 5 <120> Procedimiento para la reducción de proteínas de célula huésped en cromatografía de afinidad
- <130> P32999
- 10 <150> US 62/208.523
<151> 21/08/2015
- <160> 12
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 123
<212> PRT
- 20 <213> Artificial
- <220>
<223> dominio variable de la cadena pesada VH de <VEGF> bevacizumab
- 25 <400> 1
- Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
- Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
- Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
- Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60
- Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
- Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
- Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
- Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
- 30 <210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
35 <223> dominio variable de la cadena ligera VL de <VEGF> bevacizumab
- <400> 2

ES 2 877 532 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 128
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> dominio variable de la cadena pesada VH de <ANG-2> E6Q
<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

15 <210> 4
<211> 108
<212> PRT

ES 2 877 532 T3

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera VL de < ANG-2> E6Q

5

<400> 4

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

10

<210> 5

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 5

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 877 532 T3

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

10 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 877 532 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 124
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Ala Ala Gly Asp Ile Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

10 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 877 532 T3

<400> 9

Gln Pro Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Leu Ala Gly Gly Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 877 532 T3

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 12

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Uso de una solución acuosa de conductividad baja en una etapa de lavado de una cromatografía de proteína A para reducir el contenido de una proteína de célula huésped en el que la cromatografía de proteína A se usa para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano, en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos, en el que la proteína de célula huésped es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 8 mM.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 2 mM.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7 o mayor.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de lavado con solución acuosa de conductividad baja se precede o se sigue de una etapa de lavado con solución acuosa de conductividad alta.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de aproximadamente 20 mS/cm o mayor.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que la solución acuosa de conductividad alta comprende histidina.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina o un anticuerpo frente a factor IXa y factor X o un anticuerpo frente a IL-13 o un anticuerpo frente a amiloide beta.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.
10. Procedimiento para producir un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano que comprende las etapas de
 - a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,
 - b) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de la célula o del medio de cultivo,
 - c) poner en contacto el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un material de cromatografía de proteína A,
 - d) lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja, en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y en el que dicha proteína de célula huésped es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina,
 - e) recuperar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano del material de cromatografía de proteína A
 y producir de este modo el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano.
11. Procedimiento para purificar un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano de una muestra que comprende las etapas de
 - a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano,
 - b) purificar el anticuerpo de isotipo IgG4 o IgG1 humano con un procedimiento/etapa de cromatografía de proteína A, que comprende lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja, en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un valor de conductividad de aproximadamente 0,5 mS/cm o menos, en el que la cantidad de proteína de célula huésped se reduce y en el que dicha proteína de célula huésped es fosfolipasa de tipo B 2 (PLBL2) o clusterina.

12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que la solución acuosa de conductividad baja comprende Tris de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 8 mM.
- 5 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la solución acuosa de conductividad baja comprende fosfato de potasio de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 2 mM.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la solución acuosa de conductividad baja tiene un pH de aproximadamente 7 o mayor.
- 10 15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el procedimiento comprende adicionalmente lavar el material de cromatografía de afinidad con una solución acuosa de conductividad alta y/o con una solución acuosa de conductividad media antes o después de lavar el material de cromatografía de proteína A con una solución acuosa de conductividad baja.
- 15 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la solución acuosa de conductividad alta tiene un valor de conductividad de aproximadamente 20 mS/cm o mayor.
17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la solución acuosa de conductividad media tiene un valor de conductividad de desde más de 0,5 mS/cm a menos de 20 mS/cm.
- 20 18. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que la solución acuosa de conductividad alta o media comprende histidina.
- 25 19. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que el anticuerpo de isotipo IgG4 humano es un anticuerpo frente a P-selectina o un anticuerpo frente a factor IXa y factor X o un anticuerpo frente a IL-13 o un anticuerpo frente a amiloide beta.
- 30 20. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que el anticuerpo de isotipo IgG1 humano es un anticuerpo frente a gripe B, o un anticuerpo frente a VEGF-A, o un anticuerpo frente a CD22, o un anticuerpo biespecífico frente a HER3 y EGFR, o un anticuerpo frente a amiloide beta, o un anticuerpo frente a Her2, o un anticuerpo biespecífico frente a Ang2 y VEGF-A, o un anticuerpo biespecífico frente a antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD3.