



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 252**

51 Int. Cl.:
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04715906 .6**
86 Fecha de presentación : **01.03.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1601697**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Purificación de anticuerpos por cromatografía con proteína A e intercambio iónico.**

30 Prioridad: **28.02.2003 GB 0304576**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73 Titular/es: **Lonza Biologics plc.**
228 Bath Road
Berkshire, Slough SL1 4DY, GB

72 Inventor/es: **Bonnerjea, Julian y**
Preneta, Anna

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 288 252 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

Purificación de anticuerpos por cromatografía con proteína A e intercambio iónico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el campo de la purificación de anticuerpos en la producción biotecnológica. Es un objeto de la presente invención describir un nuevo proceso para la purificación de tales anticuerpos.

10 La cromatografía con proteína A es ampliamente utilizada en la fabricación industrial de anticuerpos, ya que permite la purificación casi completa de anticuerpos, que son generalmente de tipo IgG, en un solo paso a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Las columnas de afinidad de proteína A inevitablemente están sujetas a un cierto grado de pérdida del ligando de la columna luego de repetidas corridas. En parte, esto puede ser debido a la degradación proteolítica de la proteína A de la columna; en la fabricación industrial de anticuerpos para aplicaciones
15 farmacéuticos, no se pueden agregar cócteles inhibidores de proteasas por razones regulatorias. Desafortunadamente esta proteína A o los fragmento de proteína A contaminantes, conservan su afinidad por las IgG y son difíciles de remover del anticuerpo purificado debido a la formación de complejos existente. La remoción es obligatoria puesto que la proteína A, que es una proteína bacteriana, provocará una respuesta inmune indeseada; además, los complejos modelos formados por adición de proteína A a la IgG monomérica se han reportado como que activan los leucocitos
20 que portan Fc y el sistema del complemento, para generar actividad oxidante y de anafilatoxina *in vitro* (Balint y colaboradores, Cancer Res. 44.734, 1984).

La comercialización de la especie recombinante de proteína A según lo dispuesto en US 6,399,750, cuya especie recombinante se une a la matriz de la columna vía un simple enlace tioéster, permitió las columnas de proteína A
25 de una capacidad más alta. Como desventaja concomitante, la velocidad de pérdida de tales matrices de proteína A recombinante se incrementa con frecuencia drásticamente en contraste con muchas matrices de proteína A naturales tradicionales, unidas en múltiples puntos obtenidas por acoplamiento con CNBr. La remoción de la proteína A contaminante por lo tanto debe proceder sin la remoción concomitante de la IgG que forma complejos.

30 Balint y colaboradores (ibid.) demostraron que tales complejos de la IgG- proteína A se pueden separar de las IgG que no han formado complejos por filtración en gel. La baja producción total y la pérdida en el rendimiento del anticuerpo son las desventajas de este método.

La patente US 4,983,722 enseña la separación selectiva de proteína A contaminante a partir de una preparación de
35 anticuerpo purificado-proteína A absorbiendo la mezcla en un material intercambiador de aniones y separando ambos componentes, extrayendo secuencialmente los anticuerpos y la proteína A bajo condiciones de incremento de la fuerza iónica. Este método de resolución es altamente dependiente del pI del anticuerpo que es específico y altamente variable para un anticuerpo dado. Además, la producción total es limitada por la inclinación del gradiente de sal requerido para obtener la separación.

40 Jiskoot y colaboradores (Developments in Biological Standardisation 71, 73, 1990) divulgan el uso de columnas de intercambio aniónico como un método para remover la proteína A contaminante de una preparación de anticuerpos, sin embargo, a diferencia de la presente invención, el flujo continuo proveniente del paso de intercambio iónico no contiene anticuerpos y es por lo tanto material de desecho.

45 Es un objeto de la presente invención idear otro método para separar fragmentos de proteína A o la proteína A del anticuerpo, preferiblemente una IgG, cuyo método evita las desventajas del arte anterior. Según la presente invención, tal objeto se resuelve de conformidad con las reivindicaciones independientes 1 y 14.

50 Según la presente invención, se idea un método de purificar un anticuerpo cuyo método comprende los pasos de: Primero, purificar un anticuerpo por medio de cromatografía de afinidad con proteína A donde la proteína A es una proteína A nativa o un derivado funcional de la misma.

55 En segundo lugar, cargar el anticuerpo purificado sobre un material de intercambio iónico bajo condiciones que permiten la unión a la proteína A o su derivado funcional, y en tercer lugar colectar el anticuerpo, preferiblemente colectando al menos el 70%, más preferiblemente colectando al menos el 80%, más preferiblemente colectando al menos el 90% de la cantidad de anticuerpo cargada sobre el material de intercambio iónico en el flujo continuo del intercambiador iónico, mientras que cualquier proteína A contaminante o derivado de proteína A se une al material de intercambio iónico.

60 La proteína A es una proteína de la superficie celular encontrada en *Staphylococcus aureus*. Tiene la propiedad de unirse a la región Fc de un anticuerpo de mamífero, particularmente de los anticuerpos de la clase IgG. Dentro de una clase dada de anticuerpos, la afinidad varía levemente con respecto al origen de la especie y la subclase o alotipo del anticuerpo (revisado en Suroliá, A. y colaboradores, 1982, Protein A: Nature's Universal anticuerpo', TIBS 7.74-76; Langone y colaboradores, 1982, protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors, Advances in Immunology 32:157 - 252). La proteína A se puede aislar directamente a partir de los cultivos de *Staphylococcus aureus* que están secretando proteína A, o es más apropiadamente expresada por vía recombinante en *E. coli* (Lofdahl y colaboradores, 1983, Proc. National Acad. Sci. USA 80:697 - 701). Su uso para la purificación de anticuerpos,
65

particularmente IgG monoclonal, se describe ampliamente en el arte anterior (E. G. Langone y colaboradores, *supra*; Hjelm y colaboradores, 1972; FEBS Lett. 28:73 - 76). Para el uso en cromatografía de afinidad con proteína A, la proteína A se acopla a una matriz sólida tal como agarosa reticulada, no cargada (Sefarosa, liberada a partir de la fracción cargada de la agarosa natural), trisacril, dextrano reticulado o materiales basados en sílice. Los métodos para tal uso se conocen comúnmente en el arte, por ejemplo acoplamiento vía las funciones amino primarias de la proteína a una matriz activada con CNBr. La proteína A se une con alta afinidad y alta especificidad a la porción de Fc de IgG, de que es la región interfaz C γ 2-C γ 3 de la IgG según lo descrito en Langone y colaboradores, 1982, *supra*. Particularmente, se une fuertemente a los alotipos o subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 y los alotipos o subclases de ratón IgG2a, IgG2b, IgG3. La proteína A también exhibe una afinidad para la región de Fab de las inmunoglobulinas que son codificadas por la familia del gene V_H, V_H III (Sasso y colaboradores, 1991, J. Immunol, 61:3026 - 3031; Hilson y colaboradores, J Exp. Med., 178:331 - 336 (1993)). La secuencia del gene codificante para la proteína A reveló dos regiones funcionalmente distintas (Uhlen y colaboradores, J. Biol. Chem. 259:1695 - 1702 (1984); Lofdahl y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80:697 - 701 (1983)). La región amino-terminal contiene cinco dominios de unión a la IgG que son altamente homólogos (llamados E, D, A, B y C), y la región carboxilo-terminal ancla la proteína a la pared y a la membrana celular. Los cinco dominios de la proteína A que se unen a la IgG vía la región Fc, involucrando por ejemplo en el Fc de la IgG humana los residuos humanos 252-254, 433-435 y 311, como se muestra para la estructura cristalina en Deisenhofer y colaboradores (1981, Biochemistry 20: 2361 - 2370) y en Sauer-Eriksson y colaboradores (1995, Structure 3:265 - 278) en el caso del dominio B de la proteína A. El hallazgo de dos sitios de unión principales contiguos esencialmente en la porción Fc se ha confirmado en el estudio de NMR-solución de Gouda y colaboradores, 1998, Biochemistry 37:129 - 136. En principio, cada uno de los dominios de unión a la IgG A-E de la proteína A, es suficiente para unirse a la porción Fc de una IgG.

Además, se han encontrado ciertos alelos de la familia VH3 en el hombre que median opcionalmente la unión de la Ig humana por la proteína A (Ibrahim y colaboradores, 1993, J. Immunol. 151:3597 - 3603; V-region mediated binding of human Ig by protein A). En el contexto de la presente solicitud, en otro, separado objeto de la presente invención, todo lo que se ha dicho que se aplica a la región Fc del anticuerpo para la proteína A, se aplica también a la unión de anticuerpos vía tal alelo de la familia VH3 para la unión a la proteína A, en el caso de que la Fc-región de tal anticuerpo no permitiera por sí misma la unión de alta afinidad por la proteína A. Esto puede considerarse una realización equivalente del método principal de la presente invención basado en Fc; lo último se describe más detalladamente en las secciones subsiguientes.

Un anticuerpo IgG según la presente invención debe ser entendido como anticuerpo de tal alotipo que pueda unirse a la proteína A en un modo de alta-afinidad. Además, aparte de las porciones Fc del anticuerpo que son relevantes para la unión a la proteína A, tal anticuerpo no puede corresponderse con un anticuerpo que exista naturalmente. Particularmente en las porciones de las regiones variables de sus cadenas, éste puede ser un anticuerpo quimérico obtenido por ingeniería genética o con CDR-injertados, como los que se idean rutinariamente en el arte. Un anticuerpo IgG según la presente invención debe ser entendido como un anticuerpo tipo IgG, en resumen.

Un derivado funcional de proteína A según la presente invención se caracteriza por una constante de unión de al menos $K=10^{-8}$ M, preferiblemente $K=10^{-9}$ M para la porción Fc de la IgG2a de ratón o de la IgG1 humana. Una interacción compatible con tal valor para la constante de unión de afinidad se designa como "unión de alta afinidad" en el presente contexto. Preferiblemente, tal derivado funcional de la proteína A comprende al menos parte de un dominio de unión a la IgG funcional de la proteína A tipo salvaje, cuyo dominio se selecciona a partir de los dominios naturales E, D, A, B, C o de las muteínas obtenidas por ingeniería genética de los mismos, que han retenido la funcionalidad de unión a la IgG. Un ejemplo de tales es el fragmento funcional "Z" de 59 aminoácidos del dominio B de la proteína A, cuyo dominio puede ser utilizado para la purificación de anticuerpos, según lo publicado en US 6,013,763. Preferiblemente, un fragmento de unión al anticuerpo, sin embargo, comprende al menos dos dominios de unión Fc intactos, según lo definido en este párrafo. Un ejemplo de tales son las secuencias de proteína A recombinante divulgadas por ejemplo en EP-282 308 y EP-284 368, ambas provenientes de Repligen Corporation.

Solo o en combinación con una proteína A o un fragmento o derivado funcional de proteína A según lo definido en las secciones precedentes, además son preferidos fragmentos de proteína A que obtienen por ingeniería genética para obtener un solo punto de unión. Un solo punto de unión significa que el residuo de la proteína está unido, vía un solo enlace covalente, al material del soporte cromatográfico de la cromatografía de afinidad con proteína A. Tal unión de un solo punto, es por medio de residuos reactivos apropiados, los cuales además están idealmente situados en una posición de aminoácidos expuestos, es decir en un lazo, del N- o el C-terminal o en otro sitio sobre la circunferencia externa del pliegue de la proteína. Los grupos reactivos apropiados son por ejemplo funciones sulfhidrilos y amino. Más preferiblemente, tal proteína A recombinante o fragmento funcional de la misma comprende una cisteína en su secuencia de aminoácidos. Más preferiblemente, la cisteína está comprendida en un segmento que consiste de los últimos 30 aminoácidos del C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la proteína A recombinante, o del fragmento funcional de la misma. En una realización adicional preferida de tal tipo, la proteína A recombinante o el fragmento funcional del mismo, está unido por al menos el 50% vía un enlace tioéter sulfuro al medio del soporte cromatográfico o del material de la matriz de cromatografía de afinidad con proteína A. Un ejemplo de tal realización es el descrito en la patente US 6,399,750 de Pharmacia y está disponible comercialmente bajo las marcas comerciales Streamline™ o MabSelect™ provenientes de Amersham-Biosciences, dependiendo de la naturaleza de la matriz de soporte usada. En el presente contexto, el tioéter debe entenderse estrechamente como un esquema de una unión -S-, con independencia del contexto químico, desviándose en este sentido del lenguaje químico normal; es posible, por ejemplo, que dicho puente "tioéter" -S- sea parte de un grupo funcional mayor, tal como por ejemplo un tioéster o un acetal mezclado,

desviándose en este sentido en el contexto de la presente solicitud del lenguaje normal basado en la reactividad de los químicos. Preferiblemente, el puente tioéter es un puente tioéter en su significado químico ordinario, estrecho. Tal grupo tioéter puede ser generado, por ejemplo, haciendo reaccionar el grupo sulfidrido de un residuo cisteína de la proteína A con un grupo epóxido alojado en el material del soporte cromatográfico activado. Con un residuo cisteína terminal, tal reacción se puede llevar a cabo bajo condiciones apropiadas, como permitir solamente el acoplamiento de un grupo sulfidrido único expuesto de una proteína para resultar en un solo punto de unión de tal proteína únicamente.

En una realización particularmente preferida, la proteína A o el derivado funcional de proteína A según la presente invención es la proteína A recombinante divulgada en la patente US 6,399,750, la cual comprende un residuo cisteína obtenido por ingeniería genética juxtaterminal y es, preferiblemente por al menos el 50%, preferiblemente por al menos el 70%, acoplado al material del soporte cromatográfico a través del átomo de azufre de dicho residuo cisteína, como el único punto de unión. Adicionalmente preferido es que tal acoplamiento se haya alcanzado por medio de activación mediada por epóxido, más preferiblemente ya sea por medio de la activación con 1,4-bis-(2,3-epoxipropoxi)butano de, por ejemplo, una matriz de agarosa tal como Sepharose Fast Flow (perlas de agarosa reticuladas con epiclohidrina, Amersham Biosciences, UK) o por medio de activación con epiclohidrina de, por ejemplo, una matriz de agarosa tal como Sefarose FF. Más preferiblemente, en combinación con dicha precedente realización preferida según este párrafo, es que el primer intercambiador iónico es un intercambiador aniónico, particularmente un intercambiador aniónico basado en una amina cuaternaria tal como Q-Sepharose™ FF (Amersham-Biosciences/Pharmacia), más preferiblemente es un intercambiador aniónico que tiene el grupo intercambiador funcional Q acoplado a un soporte de matriz cuyo grupo Q es N,N,N-Trimetilamino-metil, más preferiblemente el intercambiador aniónico es Sefarose Q™ FF de Amersham Biosciences/Pharmacia. El grupo amino cuaternario es un intercambiador fuerte, el cual además no es susceptible a los cambios en el pH del buffer de carga y lavado. La matriz intercambiadora de flujo rápido se basa en perlas de agarosa de 45-165 µm que tienen un alto grado de reticulación para una estabilidad física más alta; además la sefarosa está desprovista de la fracción molecular sulfatada cargada de la agarosa natural, y no permite la adsorción no específica del anticuerpo a la matriz, incluso bajo condición de altas cargas del anticuerpo. Un ejemplo de tal realización se puede encontrar en la sección experimental.

Una proteína A contaminante es cualquier tipo de descendencia funcional de una proteína A o de un derivado funcional de la misma que se une a una IgG según lo definido previamente, la cual se obtiene luego de eluir el anticuerpo unido a partir de una columna de cromatografía de afinidad con proteína A. Tales especies de proteína A contaminante pueden resultar, por ejemplo, de la hidrólisis de los enlaces peptídicos que ocurren muy probablemente por medio de la acción enzimática, particularmente en la fabricación industrial. La cromatografía con proteína A se aplica como un paso adelantado en el procesamiento corriente abajo cuando la solución del producto fresco, purificado a groso modo, todavía mantiene considerable actividad de la proteasa. Las células que mueren en el caldo del cultivo celular, o las que se rompen en los pasos iniciales de centrifugación o filtración, es probable que liberen proteasas; por propósitos regulatorios, la suplementación del caldo de cultivo celular con inhibidores de proteasas, antes o en el curso del procesamiento corriente abajo, no se realiza generalmente, en contraste con la práctica de la investigación bioquímica. Ejemplos de tales inhibidores son el fenil-metil-sulfonil-cloruro (PMSF) o el ácido caproico. Tales agentes químicos son indeseables como aditivos en la producción de biofarmacéuticos. Es posible además que los derivados o los fragmentos funcionales recombinantes de la proteína A sean menos resistentes a las proteasas que la proteína A tipo salvaje, dependiendo de la estructura terciaria del pliegue de la proteína. Los segmentos de aminoácidos que se enlazan a los dominios de unión individuales de la IgG pudieron ser expuestos una vez que el número total de dominios de unión se reduzca. Los contactos interdominios pueden posiblemente contribuir a la estabilidad del plegamiento del dominio. Puede ser también que la unión del anticuerpo por la proteína A o por dichos derivados funcionales de la misma, influya o facilite la susceptibilidad a la acción de las proteasas, debido a los cambios conformacionales inducidos luego de la unión del anticuerpo. Una vez más la proteína A tipo salvaje o de longitud completa o los fragmentos obtenidos por ingeniería genética funcionales de la misma, pueden comportarse de manera diferente. Preferiblemente, la proteína A contaminante sigue siendo funcional, es una proteína que se une a la IgG y por tanto se asocia con el anticuerpo purificado por proteína A, cuando es cargada sobre el medio de separación de intercambio iónico. La asociación basada en alta afinidad de la proteína A contaminante con el anticuerpo purificado, es la razón por la cual es difícil separar eficientemente la proteína A contaminante del anticuerpo purificado.

Preferiblemente, el anticuerpo que se desea purificar se colecta a partir de un cultivo celular antes de purificar el anticuerpo mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Más preferiblemente, dicho cultivo celular es un cultivo de células de mamíferos. Las células de mamíferos tienen grandes compartimientos llamados lisosomas que contienen las enzimas degradantes, los cuales se rompen luego de la muerte o la recolección de las célula. Particularmente, dicho cultivo celular puede ser un cultivo celular de mieloma, tal como por ejemplo, las células NSO (Galfre, G. y Milstein, C. *Methods Enzymology*, 1981.73, 3). Las células de mieloma son células del plasmacitoma, es decir células de linaje celular linfóide. Una línea celular NSO ejemplar es, por ejemplo, la línea celular ECACC No. 85110503, libremente disponible en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom. Las NSO se han encontrado que son capaces de dar lugar a rendimientos extremadamente altos del producto, particularmente si son utilizadas para la producción de anticuerpos recombinantes. En cambio, las células NSO se ha encontrado que dan una elevación reproduciblemente a niveles mucho más altos de proteína A contaminante, en comparación con otros tipos de células hospederas, al menos con ciertos sistemas de cromatografía de afinidad con proteína A que emplean fragmentos acortados recombinantes de la proteína A tipo salvaje, cuya proteína A recombinante es posiblemente proteína A de un solo punto de unión. Un ejemplo de tal, es la resina de cromatografía de afinidad Streamline™ rProtein A (Amersham Biosciences; esencialmente proteína A recombinante unida por un solo punto al tioéster, según lo descrito en la patente US 6,399,750). Los niveles de aproximadamente o

superiores a 1000 ng de proteína A contaminante/mg de anticuerpo se podrían obtener con las columnas de afinidad Streamline rProtein A. El método de la presente invención se distingue del arte anterior en reducir eficientemente la proteína A contaminante a partir de tales niveles elevados hasta <1 ng/mg de anticuerpo en un rápido y único paso de purificación, que es con un factor de purificación de aproximadamente 1000 x.

5 Es preferido además, solo o en combinación con el párrafo precedente, que el anticuerpo que debe ser purificado por medio de cromatografía de afinidad con proteína A, no se haya tratado para inactivar las proteasas en o después de la recolección, más preferiblemente que no esté en mezcla con al menos un inhibidor de proteasa suplementado exógenamente después de la recolección. Preferiblemente, dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que
10 consiste en PMSF, péptidos que inhiben específicamente proteinasas, según lo descrito en Laskowski y colaboradores, 1980, Protein inhibitors of proteinases, Ann. Rev. Biochem, 49, 593-626, y ácido caproico epsilon.

La operación de cromatografía de afinidad con proteína A se ha descrito extensamente en la literatura técnica y no necesita ser descrita adicionalmente. Otro ejemplo, aparte de los anteriormente citados, se describe en Duhamel y
15 colaboradores, J. Immunological Methods 31, (1979) 211-217, referente a la elución por un gradiente de pH de las IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, a partir de proteína A-Sefarosa.

Preferiblemente, la proteína A contaminante se reduce a una concentración < 10 ng/mg de anticuerpo, preferiblemente < 4 ng/mg de anticuerpo, y más preferiblemente < 1 ng/mg de anticuerpo en el flujo constante del primer intercambiador iónico, donde el anticuerpo debe ser preferiblemente entendido que se refiere a una IgG. El método de ensayo Elisa para la validación de estos valores de umbral, se describe detalladamente en la sección experimental; debe notarse que la acidificación de la muestra a $\text{pH} \leq 4$, preferiblemente en presencia de un detergente suave, es crucial para la determinación exacta de la cantidad de proteína A que se ha perdido. No es necesario decir que este umbral debe ser entendido tal como que la capacidad de carga del primer intercambiador iónico para la unión a
20 la proteína A nunca se excede, conduciendo inevitablemente la penetración de la proteína A contaminante. Un método basado en Elisa apropiado para ensayar fragmentos de proteína A o proteína A, se describe en la patente US 4,983,722. Anticuerpos anti-proteína A apropiados están disponibles comercialmente, por ejemplo, provenientes de Sigma-Aldrich. En particular, al usar derivados de proteína A, los cuales se han obtenido por ingeniería genética, para mantener grupos sulfhidrilos adicionales, es importante el mantenimiento apropiado del estándar de la proteína. Puede ser importante verificar el carácter monomérico de tal derivado puro de proteína A, usado como un estándar para la cuantificación de la muestra de prueba, puesto que los dímeros o multímeros covalentes formados mediante puentes
25 -S-S- podrían conducir a resultados incorrectos. La verificación se puede lograr fácilmente por análisis de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras, como es habitual en el arte. La reducción de tal derivado de proteína A-solución estándar por medio de DTT o de beta-mercaptoetanol, ayuda por consiguiente a evitar errores de medición
30 en la técnica ELISA.

Adicionalmente preferido es, en el método según la presente invención que al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% del anticuerpo cargado sobre el primer intercambiador iónico, se puede recuperar en flujo constante del intercambiador iónico.
40

El primer intercambiador iónico según la presente invención es una resina de intercambio aniónico; la proteína A se puede unir por ambos tipos de resina según lo descrito (EP-289 129 B1). El primer intercambiador iónico o intercambiador aniónico puede ser operado en el modo de columna a cierta velocidad de flujo o en modo de operación de lote, sumergiendo la resina de intercambio iónico en una solución de la muestra suavemente agitada y posteriormente intercambiando los medios líquidos por mediante filtración subsiguientemente. Tomando el pI de un anticuerpo
45 dado, es posible definir condiciones apropiadas de pH y de fuerza iónica para cargar el primer intercambiador iónico, cuyas condiciones dan lugar a retener el anticuerpo en el flujo continuo, mientras que la proteína A contaminante es unida y removida así del anticuerpo. Como se ha dicho antes, el método según la presente invención permite una separación más rápida del anticuerpo de la proteína A contaminante. Ejemplos de grupos funcionales de tal primer intercambiador aniónico que se unen al soporte de una matriz son, por ejemplo, grupos amino primarios, secundarios, y particularmente terciarios o cuaternarios, tales como aminoetil, dietilaminoetil, trimetilaminoetil, trimetilaminometil y dietil-(2-hidroxipropil)-aminoetil. Los soportes apropiados de las matrices cromatográficas para el intercambiador aniónico se conocen en el arte. Ejemplos de ellos son las resinas y perlas basadas en agarosa, perlas de dextrano, perlas del poliestireno y resinas de poliestireno/divinil-benceno. Más preferiblemente, el intercambiador aniónico es un intercambiador iónico basado en una amina cuaternaria montado sobre una matriz de agarosa tal como, por ejemplo, Sepharose CL-6B o Sepharose Fast Flow (FF) de Amersham-Biosciences/Pharmacia. Un ejemplo de tales es la Q-Sefarosa de Amersham-Biosciences/Pharmacia. Un ejemplo de tal es la Sepharose QTM proveniente de Amersham-Biosciences/Pharmacia. Otro aspecto adicionalmente preferido conjuntamente con el uso de un primer intercambiador aniónico, es que el anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal que tiene un punto isoeléctrico (pI) que sea al menos dos unidades de pH por encima, que es más básico que el pI de la proteína A usada en el paso precedente de cromatografía de afinidad con proteína A; por ejemplo, mientras que la proteína A nativa A tiene un pI de cerca de 5.0, proteína A recombinante Streamline tiene un pI de cerca de 4.5. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene punto isoeléctrico (pI) que es al menos 6.5 o por encima, preferiblemente es 7.0 o por encima, preferiblemente tiene un pI de al menos 7.5 o por encima. Debe ser notado que éste se refiere al pI del anticuerpo de hecho recolectado y purificado, y no el pI que se puede simplemente predecir a partir de la secuencia de aminoácidos solamente. La molécula de anticuerpo de hecho purificada puede haber experimentado otras modificaciones de la estructura principal del polipéptido, tales como glicosilación, cuyas modificaciones pueden agregar residuos cargados y pueden haber cambiado así el pI de la molécula. Luego de la determinación del pI para el anticuerpo del producto por medio de focalización
65

isoeléctrica (IEF), la microheterogeneidad del procesamiento post-transduccional de la proteína del anticuerpo, por ejemplo, la proteína de un anticuerpo monoclonal, conduce a un rango de p_i más amplio para las moléculas individuales glicoproteicas de anticuerpos del producto, las que se asemejan a una mancha en un gel IEF en lugar de una sola banda, y así da a un valor numérico específico para al menos la mayoría del producto. El p_i de un anticuerpo se refiere a aquella porción de las moléculas del producto de anticuerpo cuyo p_i está dentro del rango preferido de p_i , según lo especificado arriba. Todas las otras definiciones de esta descripción, tales como el porcentaje del anticuerpo recuperado después de un paso dado de purificación, se refieren a dicha porción de anticuerpos que es compatible con el p_i solamente.

El modo de operación de un primer intercambiador aniónico requiere el intercambio de buffer del eluato ácido o neutralizado del paso de cromatografía de afinidad con proteína A, con el buffer de equilibrio del primer intercambiador aniónico. El buffer de equilibrio y el buffer de carga son idénticos en el método de la presente invención. Dispositivos de ultrafiltración comúnmente empleados, tales como los provenientes de Amicon o Millipore, se puede utilizar de manera eficaz para ese propósito; éstos evitan los efectos de la dilución mientras que utilizan matrices de filtración porosas de poco peso molecular, tales como por ejemplo Sephadex G-25. El buffer de equilibrio tiene preferiblemente una concentración de sal, de una sal desplazadora (displacer salt) tal como cloruro de sodio, por ejemplo, en el rango entre 1 a 150 mM, más preferiblemente entre 5 a 110 mM, más preferiblemente entre 20 a 100 mM de sal. El pH del buffer de equilibrio está preferiblemente en el rango de pH 6.5 a pH 9.0, preferiblemente está en el rango de pH 7.5 a pH 8.5, preferiblemente está en el rango de pH 7.9 a pH 8.4. Debe tenerse en cuenta que la función amino del N-terminal de una proteína tiene un valor de pK_s de cerca de 9.25, así pues al unirse la proteína A contaminante y cualquier otra proteína ya cargada negativamente a un intercambiador aniónico, ésta se pondrá más fuerte a un más básico; para una aplicación dada, el pH del buffer de carga podría necesitar ajustarse para la discriminación óptima de la unión o no-unión para un par dado de anticuerpo y proteína A contaminante que tengan valores de p_i diferentes y diferentes contenidos de cisteína e histidina en las cadenas laterales que puedan contribuir a los cambios en la carga dentro de los rangos de pH seleccionados. Además, un pH más básico interfiere con las interacciones del anticuerpo con la proteína A, al provocar un incremento en la fuerza iónica; asimismo, la fuerza iónica necesita ser ajustada para balancear la prevención de la unión del anticuerpo con la necesidad de suprimir la unión de la proteína A contaminante. Es evidente para el artesano experto, que la fuerza iónica del buffer generalmente está correlacionada inversamente con el valor del pH; mientras más fuertemente se une la proteína A al intercambiador aniónico dependiendo del pH, más sal es tolerada para prevenir la unión del anticuerpo y para interferir con las interacciones potenciales anticuerpo-proteína A. Así, los anteriores rangos dados para el pH y la sal desplazadora, deben ser entendidos como que se correlacionen: cuanto más bajo es el pH, menos sal se encuentra permitida dentro de los rangos preferidos dados previamente para trabajar la invención. La carga adicional de sal es agregada por la sustancia amortiguante del pH, incrementándose adicionalmente la fuerza iónica de la solución. La fuerza iónica se puede determinar midiendo la conductividad del buffer de equilibrio. El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos, lo que da la medida de la cantidad total de iones que toman carga adicional y la motilidad del ión en consideración. Por lo tanto, con una cantidad en incremento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida para la conductividad es mS/cm (milliSiemens/cm), y se puede medir usando un medidor de conductividad, por ejemplo, proveniente de Topac Inc. (Hingham, MA/U.S.A.) o un Honeywell disponible comercialmente. En el contexto de la presente invención, todos los valores numéricos pertenecen a la conductividad específica a 25°C. Preferiblemente, el buffer de carga o de equilibrio para el primer paso de intercambio aniónico tiene una conductividad de 0.5-5 mS/cm, más preferiblemente de 1-3 mS/cm, y más preferiblemente aún de 1.25-2.5 mS/cm. Idealmente, tiene una conductividad de cerca de 2 mS/cm. Ejemplos de sales apropiadas para el buffer se pueden encontrar en Good, N. E. (1986, *Biochemistry* 5:467-476). Por ejemplo, el buffer Tris·HCl o un buffer de fosfato de hidrógeno sódico son empleadas habitualmente como sustancias amortiguantes apropiadas. La concentración de la sustancia en el buffer está normalmente en el rango de, por ejemplo, 10-40 mM de la sal en el buffer. Entre las especies de aniones potenciales útiles para diseñar una buffer, se prefieren aquellas que tienen una fuerza específica más baja de elución del anión con respecto al cloruro, cuyas propiedades de fuerza de elución baja se correlaciona aproximadamente de forma inversa con la densidad de la carga iónica y es aproximadamente proporcional al tamaño iónico. Las comparaciones empíricas de la fuerza de elución aniónica están tabuladas en los libros de textos estándares de bioquímica. Más preferiblemente, la sustancia del buffer según la presente invención es un fosfato. El fosfato de hidrógeno tiene una fuerza baja de elución, particularmente si es empleado en un pH de o por debajo de pH 8, y se distingue adicionalmente por sus propiedades caotrópicas particularmente bajas.

Mientras que la operación del modo de lote es posible, la operación de modo columna se prefiere para el primer paso del intercambiador aniónico. En ese caso, una velocidad de flujo de cerca de 10 a 60 ml/h se puede emplear ventajosamente. La concentración de la carga del anticuerpo cargado puede favorablemente estar en el rango de la 10 a 30 mg de anticuerpo/ml resina de intercambio. Resulta evidente que el uso de muestras extremadamente diluidas daría lugar al rendimiento disminuido del anticuerpo, como es conocido para una persona experta. El anticuerpo a ser purificado se colecta en el flujo continuo de la operación de carga, incluyendo cerca de un volumen de lavado de la columna con el mismo buffer de equilibrio. El pH del flujo constante se puede ajustar a pH neutro para mejorar la estabilidad y prevenir la agregación y/o la precipitación de la proteína del anticuerpo.

Después del primer intercambiador aniónico, el anticuerpo está listo para ser usado en aplicaciones o se puede considerar que requiere que sea adicionalmente purificado por métodos habituales de purificación. En otra realización preferida, el primer paso de intercambio iónico es seguido por un segundo paso de intercambio iónico, en cuyo segundo paso el anticuerpo es cargado y unido por el segundo medio de intercambio iónico y se eluye con un buffer

diferente del buffer de carga, por medio de la sal y/o el pH incrementados, como un anticuerpo esencialmente monomérico, no-agregado. “Esencialmente” significa menos del 5% en este contexto. Preferiblemente, solamente o en combinación con una realización preferida descrita en las secciones precedentes, el segundo intercambiador iónico es un intercambiador catiónico. Tal combinación de un paso de cromatografía con proteína A seguido por un primer intercambiador aniónico y un segundo paso de intercambiador catiónico es novedoso. Es bien conocido que la mayoría de las proteínas contaminantes en pequeña cantidad del caldo de los cultivos celulares, tienen valores mucho más bajos de pI que los anticuerpos, particularmente que los anticuerpos IgG; el intercambio catiónico por lo tanto permitirá la remoción eficiente del anticuerpo agregado y de agentes infecciosos potenciales tales como cápsides de virus, así como de proteínas contaminantes diferentes del anticuerpo. Debido a la rápida operación, la recuperación muy eficiente del anticuerpo después de la carga, la unión a y la elución a partir de la columna y la alta capacidad del carga, permite además de la operación repetida y cíclica con un solo lote del anticuerpo, con el efecto aditivo del factor de purificación alcanzado en un sola ronda de unión y elución. Preferiblemente, el pH del buffer de carga es aproximadamente un de pH 4 a 7, preferiblemente un pH de 4.01 a 6, y más preferiblemente un pH 4.02 a 5.5. Además es preferido que el anticuerpo se eluya a partir del intercambiador catiónico con un gradiente de sal en el rango entre 0.1 a 1.2 M, donde la sal es preferiblemente una sal de metal alcalino, preferiblemente una sal de litio, de potasio o de sodio. Preferiblemente, la elución ocurre a un pH de 7 a 8, con el objetivo de maximizar la remoción de agregados y minimizar el daño al anticuerpo debido a las condiciones ácidas. Opcionalmente es preferido, que la elución ocurra a un pH ácido de pH 4 a 7, preferiblemente de 4.01 a 6 para maximizar la eliminación de la proteína A contaminante; niveles tan bajos como < 0.4 ng/mg de anticuerpo de se pueden alcanzar de esta manera. Este segundo paso de intercambiador catiónico hace a la tradicional filtración en gel cuestionable, mientras que permite la gran capacidad así como la operación rápida como es típico para los intercambiadores iónicos. Los intercambiadores iónicos soportan cargas de 10-30 mg de anticuerpo/ml de resina. En una realización particularmente preferida, el método de purificación de un primer paso de un intercambiador aniónico y un segundo paso de un intercambiador catiónico en los resultados de la cromatografía con proteína A, rinde un anticuerpo de grado clínico en ausencia de otro paso terminal de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), cuyo paso de SEC tendría que separar por el peso molecular apropiado los agregados del anticuerpo y/o los complejos del anticuerpo-proteína A del anticuerpo monomérico, tal como una IgG normal.

Como nota general, el método de la presente invención no se puede explotar para los anticuerpos que se han desarrollado contra los epitopes que porta la proteína A. Se excluyen tales anticuerpos, aunque esto es una limitación obvia para el artesano experto.

La característica más atractiva del método de la presente invención es que en la purificación de anticuerpos vía un intercambiador aniónico en un modo de flujo constante o no unión, la capacidad de la columna no es limitante para el rendimiento del material; la capacidad es solamente decisiva con respecto a la retención de cantidades menores de proteína A contaminante. Esto ahorra muchos de recursos materiales y tiempo de procesamiento, mientras que permite la remoción muy eficiente de la proteína A contaminante.

Experimentos

1. Elisa para la proteína A

Se han descrito numerosos Elisis para ensayar la proteína A o la proteína A recombinante (véase la patente US 4,983,722 y las referencias allí descritas). Para todo el trabajo descrito más abajo, se utilizó un simple Elisa tipo sándwich, en el cual el anticuerpo anti-proteína A de captura se utilizó para recubrir una placa de microtítulo de 96 pozos de fondo plano (Nunc™) en cual retiene la proteína A. Unido a la proteína A entonces se detecta un anticuerpo de detección anti-proteína A biotilado, el cual permite la unión adicional del conjugado de peroxidasa de rábano picante-estreptavidina (Amersham #RPN 1231). El anticuerpo de conejo anti-proteína A disponible comercialmente (desarrollado contra la proteína A natural de *S. aureus*) para la captura está disponible comercialmente a partir de Sigma-Aldrich (#P-3775). Este fue el anticuerpo que se utilizó para este estudio. El anticuerpo de conejo de detección fue igualmente comprado a Sigma-Aldrich (#3775). Después de recubrir la proteína mediante un proceso de adsorción no específico, la proteína revestida se utiliza para retener el anticuerpo de captura específico para proteína A-proteína A, cuyo anticuerpo de captura se detecta adicionalmente con el anti-proteína A de conejo biotilado y el conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. La tetrametil bencidina se utiliza como sustrato cromogénico. Las muestras, de concentración desconocida, se len contra una curva estándar usando la proteína A parental o el derivado de proteína A de la proteína A contaminante que se desea detectar. El recubrimiento a pH ácido, así como la preparación apropiada del estándar, demostraron ser importantes. En particular, para la proteína A recombinante, portar el residuo cisteína adicional, por ejemplo, en el caso de la proteína A Streamline™ (Amersham-Biosciences, anteriormente Pharmacia), se encontró que la solución estándar requirió tratamiento previo con un agente reductor de sulfidril para asegurar el estado monomérico de la proteína de la solución estándar.

La proteína A tipo salvaje estándar, en contraste, está disponible comercialmente a partir de un número de compañías, por ejemplo, Sigma-Aldrich/Suiza (#P6031) o Pharmacia (#17-0770-01) y no requiere tal tratamiento previo. Para los experimentos descritos debajo observando la pérdida de la proteína A contaminante de la matriz Streamline™, las muestras de proteína A recombinante sin conjugar, obtenidas a partir del fabricante, fueron utilizadas como estándar.

ES 2 288 252 T3

1.1 Pre-tratamiento de proteína A estándar enriquecida con Cys

La proteína A-Cys pura recombinante estándar, como en la comercialmente Streamline™, del material de la columna de cromatografía de afinidad con proteína A (Amersham-Biosciences) fue obtenida liofilizada a partir de Pharmacia/Amersham-Biosciences. Hasta 20 mg/ml de proteína fueron disueltos en 0.1 M de Tris pH 8 que contiene 0.5 M de NaCl, 1 mM de EDTA y ditioneitol 20 mM, incubados por 15-30 min a temperatura ambiente y desalinizados con una columna de filtración en gel PD-10 desechable (Amersham Biosciences). Todas las soluciones amortiguadoras utilizadas para manipular la solución estándar antes del recubrimiento, deben ser tratadas con N₂ para prevenir la oxidación de los grupos de tiol. La preparación del estándar de la proteína fue realizada en el mejor de los casos inmediatamente antes del uso del estándar para recubrir las placas de microtítulo. Opcionalmente, una solución estándar de 1 mg/ml fue preparada y mantenida a -65°C en un congelador; después de descongelar, el carácter monomérico de la proteína A fue ensayado a partir de una alícuota cargada sobre SDS-PAGE no reductor. La concentración del estándar de la proteína fue determinada por el ensayo de Bradford (Bradford y colaboradores, 1976, Anal. Biochem. 72:248 - 254; Splittgerber y colaboradores, 1989, Anal. Biochem. 179:198 - 201) así como por análisis automatizado de aminoácidos. El resultado de tal tratamiento previo se muestra en la Fig.1 por medio de 10% SDS-PAGE no reductora para una proteína A de estafilococos estándar (carril 1: proteína A nativa; carril 2: después del pre-tratamiento) y proteína A recombinante Streamline desacoplada y pura, proporcionada por cortesía de Pharmacia, ahora Amersham-Biosciences); carril 4: proteína A recombinante nativa; carril 5: después del pre-tratamiento). El carril 1 es un marcador del peso molecular con las masas moleculares correspondientes que son denotadas en el eje vertical. La proteína A recombinante de Pharmacia que porta un residuo adicional Cys cambia después de la reducción a peso molecular más bajo; una banda monomérica de aproximadamente 34 kD es preservada y mucho más intensa, proviniendo obviamente de la disociación de los dímeros formados por los puentes disulfuro.

1.2 Elisa

1.2.1 Preparación de la muestra

Mediante dos pasos de dilución, se preparó una dilución de 1:200.000 de 1 mg/ml de la solución madre estándar de proteína A para proporcionar el estándar superior a 50 ng/ml. De éste, se prepararon las diluciones abajo a 0.2 ng/ml para ensayar la curva estándar. Además, las diluciones del estándar (“soluciones dosificadoras”) fueron utilizadas para dosificar las muestras duplicadas del producto a ser probadas, para excluir la presencia de sustancias que interfirieron en la muestra.

Para ensayo de la muestra del producto final, cada muestra se divide en 2 volúmenes iguales de 500 µg. Una es dosificada con 1000 ng/ml de la solución dosificadora, o la solución de 10 µg/ml si es apropiado, para dar un contenido final de proteína A de 10 ng de proteína A por mg de anticuerpo. La otra mitad es dosificada con el mismo volumen del buffer de la muestra; así se explica el factor de dilución de la muestra del producto debido a la dosificación. Ambos tipos de preparaciones serán referidas como “muestra dosificada” en lo adelante. La muestra del buffer se hizo con hasta 7.51 g Glicina (base), 5.84 g NaCl, 0.5 ml Triton X-100 para un volumen de 1 L con agua desionizada o bidestilada.

Para las mediciones exactas óptimas, las concentraciones del anticuerpo en las muestras se determinaron por Elisas habituales bien conocidos en el arte. Otra solución estándar fue dosificada con una cantidad igual de un anticuerpo estándar conocido de afinidad de la región constante comparable para proteína A, para determinar la eficacia del paso de acidificación y desentrañar cualquier error sistemático potencial introducido por el anticuerpo que se une a la proteína A y así recuperarla de la captura en el ensayo.

Acidificación: Para 450 µl de la muestra dosificada o del estándar se agregan 200 µl del buffer compuesta de citrato/0.05% Tritón X-100 a pH 3.0. Todas las muestras fueron hechas por triplicado. Además, las diluciones de la muestra fueron preparadas y ensayadas por triplicado ya que el ensayo trabaja óptimamente para concentraciones del anticuerpo que están en el rango de 1 mg/ml y 0.2 mg/ml. El paso de la acidificación es crucial en el presente ensayo para liberar la proteína A o los fragmentos de proteína A contaminantes que estuvieran unidos de otra manera al exceso de anticuerpo presente en la solución de la muestra.

1.2.2 Recubrimiento de las placas de microtítulo con el anticuerpo

El buffer de recubrimiento se hizo con hasta 1.59 g/l de Na₂CO₃, 2.93 g/l de NaHCO₃ y 0.20 g/l de azida de sodio. El pH del buffer fue ajustado a pH 9.6. Se agregaron 100 µl de la solución de anticuerpo por pozo, la cual comprende el anticuerpo en una cantidad suficiente como para no mostrar saturación para el estándar de proteína A. La placa es cubierta con una película plástica y situada en cámara de humedad. Se incubó a 37°C durante la noche por aproximadamente 18 horas. Todos los pozos se enjuagan 3 veces con al menos 300 µl de buffer de lavado [NaCl 5.8 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, NaH₂PO₄·H₂O 0.26 g/l, EDTA 3.7 g/l, Tween-20 0.2 g/l, 10 ml/l butanol, pH 7.2], y se golpean ligeramente en seco. Se agregan 250 µl de buffer [el buffer de recubrimiento con caseína hammarsten al 0.5%] a cada pozo y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en una zaranda orbital benchtop (velocidad 120 RPM). Se enjuagan todos los pozos tres veces con al menos 300 µl del buffer de lavado, y se de un golpe ligero seco.

ES 2 288 252 T3

1.2.3. Incubación de la muestra y detección

Se completan los estándares y las muestras incluyendo cualquier muestra dosificada con 100 μ l/pozo. Se cubre con una película plástica y se incuba por 90 minutos a temperatura ambiente en una zaranda orbital benchtop. Se enjuagan todos los pozos tres veces con al menos 300 μ l del buffer de lavado, y se da un golpe ligero seco. Se diluye el anti-proteína A de conejo biotilado en la dilución óptima previamente resuelta. Se agrega 100 μ l/pozo, se cubre con una película plástica y se incuba por 90 minutos a temperatura ambiente en una zaranda orbital. Repetir el enjuague.

Se diluye la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante en la dilución óptima anteriormente determinada, usando el buffer de conjugado [Na_2HPO_4 1.15 g/l, NaCl 5.84 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.26 g/l, EDTA 3.73 g/l, Triton X-100 0.05% (v/v), pH 7.2]. Se agregan 100 μ l/pozo, se cubre con una película plástica y se incuba por 45 minutos a temperatura ambiente en una zaranda orbital. Repetir el enjuague. Se agregan 100 μ l de la solución sustrato tetrametil bencidina recién preparada (TMB, ICN número de producto #980502). La solución sustrato se prepara como sigue: Una solución madre es preparada disolviendo 10 mg de TMB en 1 ml de DMSO. 10 μ l de esa solución, además de 10 μ l de H_2O_2 , se le agregan a una solución acuosa de acetato de sodio al 2.05% (p/p) a la que se le ajusta el pH a 6.0 con ácido cítrico 0.5 M. Es evidente que toda el agua usada para preparar cualquier reactivo del ensayo es de la más de alta calidad, es decir es agua ultrapura desionizada o al menos bidestilada.

La solución del sustrato se incuba por 8-11 minutos a temperatura ambiente en una zaranda. La reacción entonces se detiene agregando 50 μ l por pozo de la solución de tención [H_2SO_4 13%]. En el plazo de 10 minutos después de la adición de la solución de detención, se determina la absorbencia de los pozos a la longitud de onda de 450 nanómetros en un espectrofotómetro de placa de lectura. El límite de detección para tal Elisa es de 0.2 ng/ml de proteína A, con un rango de trabajo desde 0.2 hasta 50 ng/ml. La intervareabilidad del ensayo es menor del 10%. La Figura 2 muestra los niveles de proteína A recombinante perdida en los eluatos de anticuerpo provenientes de la cromatografía con proteína A recombinante Streamline™ con la proteína A unida en un solo punto por enlace tioéter. El número de ciclos se refiere al uso repetido después de la elución con cloruro de sodio 1 M y re-equilibrio. Mientras que la pérdida proveniente del caldo de cultivo de los cultivos celulares del hibridoma, estuvieron típicamente en el orden de 500 ppm, otros tipos de células dieron niveles de hasta 1000 ppm. Una visión general del índice de pérdida de matrices de diferentes fuentes, se da en la Tabla 1; la cromatografía fue realizada según las instrucciones del fabricante.

TABLA 1

Matriz	Proveedor	Química del acoplamiento	Enlace típico (p.p.m.)	Capacidad de trabajo (mgml^{-1})	Velocidad de Flujo (cmh^{-1})
Native ProteínaA Sepharose 4FF	Amersham-Biosciences	CNBr unida en múltiples puntos	10-20	5-20	30-300
rmp ProteínaA Sepharose	Amersham-Biosciences	Unida en múltiples puntos	10-20	5-20	30-300
Poros A High Capacity	Applied Biosystems	Unida en múltiples puntos	10-50	10	500-1000
PROTEIN a Ceramic Hyper D	Biosepra	Unida en múltiples puntos	Hasta 300	10-20	200-500
rProtein A Sepharose	Amersham-Biosciences	Unida en un solo punto por enlace tioéter	50-1000	20-20	30-300
MabSelect	Amersham-Biosciences	Unida en un solo punto por enlace tioéter	50-1000	20-40	500
Streamline™ rProtein A	Amersham-Biosciences	Unido en un solo punto por enlace tioéter	50-1000	20-40	200-400

ES 2 288 252 T3

La Figura 3 proporciona adicionalmente datos sobre la pérdida insustancialmente reducida de proteína A contaminante durante las corridas repetidas de cromatografía de afinidad con proteína A con el mismo material de la matriz de afinidad; la proteína A tipo salvaje unida en múltiples puntos a la Sepharose 4FF (Amersham-Biosciences) fue utilizada en varias ocasiones según lo descrito en la sección 2.1 debajo, y el nivel de la proteína A contaminante en el eluato, antes del procesamiento del eluato, fue determinado por Elisa como se describe anteriormente.

2. Cromatografía en Q-Sepharosa y Proteína A

2.1 Cromatografía de afinidad con proteína A con Streamline™

El sobrenadante del cultivo celular de un cultivo celular del mieloma NSO fue purificado a grosso modo por centrifugación y más completamente por filtración concentrándose por ultrafiltración; la ultrafiltración también fue utilizada para intercambiar el líquido del cultivo por PBS pH 7.5. El título del anticuerpo #5 producido por célula fue de 0.2 mg/ml, un total de 1 L del sobrenadante intercambiado por buffer fue cargado. El pi del anticuerpo monoclonal #5 fue 8.5. La columna de proteína A Streamline™ (5.0 ml de volumen) fue equilibrado previamente con 10 volúmenes de columna de glicina/glicinato 50 mM pH 8.8, NaCl 4.3 M; la velocidad de flujo fue de 200 cm/h. Para la carga, la columna fue operada a una velocidad de flujo de 50 cmh⁻¹; la capacidad de la carga fue de aproximadamente de 20 mg/ml del material de la matriz. Antes de la elución, la columna fue lavada con al menos 10 volúmenes de la columna con buffer de equilibrio de glicina, suplementado con 200 mM adicionales de NaCl y 0.1% Tween-20. La elución fue alcanzada con el buffer de elución compuesto de buffer 0.1 M glicina/HCl pH 4.0. Inmediatamente después de la elución, las fracciones del eluato que comprendían el pico de anticuerpo, fueron neutralizadas con una alcuota adecuada de 0.5 M Tris HCl pH 7.5 y el buffer intercambiado con un dispositivo de diafiltración Amicon con el buffer del carga/equilibrio (10 mM Tris/HCl pH 8.0, NaCl 50 mM) de la presente invención para el paso subsiguiente de intercambiador aniónico para evitar una exposición más larga al pH ácido.

La concentración del anticuerpo y la concentración de la proteína A contaminante fueron determinadas como se describe anteriormente. El nivel de proteína A contaminante en el eluato totalizó 1434 ng/mg de anticuerpo antes y 1650 ng/mg de anticuerpo después de la diafiltración. La recuperación del anticuerpo basada en el título del sobrenadante intercambiado con el buffer antes de la carga fue del 81%; la concentración del anticuerpo en la solución diafiltrada fue de 3.6 mg/ml.

2.2 Paso de intercambio aniónico en Q-Sepharose FF en modo de no unión

El anticuerpo purificado de la sección 2.1 fue procesado adicionalmente según lo descrito: Una columna de 5.0 ml de Q-Sepharose FF (Amersham-Biosciences) fue empacada con 10 ml de NaOH 0.1 M, seguido por 2 volúmenes de la columna de Tris 0.1 M pH 8, y equilibrada en 10 volúmenes de la columna con Tris 10 mM pH 8/NaCl 50 mM, a una velocidad de flujo de 75 cm/h. Después del equilibrio, la velocidad de flujo fue reducida a 50 cm/h. 6 ml de la solución diafiltrada del anticuerpo, fueron cargados sobre la columna y el flujo constante fue colectado para su procesamiento posterior; el flujo constante fue continuado hasta ser colectado, después cargando la columna con los 6 ml iniciales y continuando después con el buffer de carga o equilibrio puro Tris 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, la absorción del flujo constante monitoreada a 280 nm regresó nuevamente a la línea de base. La recuperación total del anticuerpo en el flujo constante fue de 23 mg de anticuerpo (87%). La determinación del nivel de proteína A contaminante resultó en < 3 ng/mg de anticuerpo.

Se encontró que el procesamiento posterior de esta lote de anticuerpo purificado por Q-Sepharosa por filtración en gel (cromatografía por exclusión de tamaño, SEC) sobre Sefacryl S-300 en buffer fosfato 10 mM pH 7.0, NaCl 140 mM, a una velocidad de flujo de 10 cm/h con una proporción de carga de 15 mg de anticuerpo por ml de gel, no cambió sustancialmente más el nivel de traza de la proteína A contaminante. Por experiencia, la SEC se puede utilizar para reducir de forma adicional los niveles de la proteína A contaminante desde aproximadamente 30-100 ng/mg hasta aproximadamente 1-5 ng/mg. Así, la SEC tiene un factor muy bajo de purificación con respecto a las cantidades trazas de proteína A, posiblemente debido a las interacciones de afinidad entre el anticuerpo y el contaminante A.

Sin embargo, debido a la inevitable dilución de la muestra y al lento procesamiento que provoca la misma disminución de la proteína del anticuerpo, SEC solamente permitirá la recuperación del 70% de la cantidad de anticuerpo cargada. Esto significa que la SEC resultará inevitablemente en la pérdida de material, mientras que requiere mucho tiempo.

La columna de Q-Sepharosa fue reciclada para su uso posterior mediante elución en NaCl 2 M y Equilibración adicional, como se describe anteriormente.

3. Purificación por Q-Sepharosa y proteína A con un paso subsiguiente de intercambio catiónico

En un experimento adicional, se utilizó el anticuerpo proveniente del experimento 2.2 purificado en un modo de no unión por intercambio aniónico en Q-Sepharosa. En lugar de probar otro paso adicional de purificación por SEC final, el anticuerpo colectado en el flujo constante de la columna de Q-Sepharosa, fue sometido a un segundo

ES 2 288 252 T3

paso de intercambiador catiónico, con una matriz de SP-Sefarosa FF (SP = Sulfopropil-) proveniente de Amersham-Biosciences. La SP-Sefarosa FF permitió una velocidad de flujo de 100 cm/h con un rendimiento reproducible de anticuerpo del 93% después de cargar, lavar y eluir el anticuerpo a partir del intercambiador catiónico.

5 Para la carga, el pH de la solución del anticuerpo obtenida después del paso de purificación en Q-Sefarosa, fue ajustado a pH 4.5-5.0 con buffer acetato 50 mM, pH 4.5. La capacidad de carga fue fijada a 10 mg/ml del material de la matriz, a una conductividad de la carga de 17 mS/cm. El buffer acetato 50 mM fue utilizado adicionalmente para lavar hasta la línea de base. Un buffer acetato de Na 50 mM pH 4.5, NaCl 1 M de alta carga de sal, fue utilizado para la elución del anticuerpo; el anticuerpo monomérico eluyó primero, mientras que los agregados eluyeron en las fracciones de la cola a elevada fuerza iónica. El uso de un gradiente de sal menos abrupto, mediante la implementación un gradiente de sal en el buffer de elución antes de bombear la columna es igualmente factible; el uso directo de un buffer de alta carga de sal, da lugar a anticuerpo menos diluido y por lo tanto más precisamente muestreado, y a tiempos más cortos de residencia en la solución ácida. Después de la elución, el buffer ácido fue intercambiado rápidamente por PBS pH 7.5. El nivel de la proteína A contaminante en el eluato reunido fue determinado con < de 0.4 ng/mg de anticuerpo, el anticuerpo mostró ser > 99% monomérico mediante HPLC de exclusión por tamaño.

4. La cromatografía de afinidad de proteína A Streamline™ con proteína A hecha por encargo y unida en múltiples puntos

20 Esta matriz de afinidad de proteína A Streamline™ con proteína A en múltiples puntos, fue hecha por encargo y proporcionada por Pharmacia Biotech (ahora Amersham-Pharmacia). Fue hecha por el fabricante mediante acoplamiento de la misma proteína A Streamline™ tipo recombinante de 34 kD, y que contiene un residuo terminal Cys, al mismo material de la matriz de Sefarosa, pero utilizó la química tradicional empleada en CNBr para la activación y acoplamiento en lugar de las condiciones para la activación y las condiciones selectivas mediadas por epóxido, para el acoplamiento de los grupos -SH solamente (véase la información del producto del fabricante). El método del experimento 2.1 fue repetido y el nivel de la proteína A contaminante fue determinado con 353 ng/mg de anticuerpo. Esto significa que el modo de acoplamiento parcialmente explica la pérdida creciente de proteína a partir de las matrices de afinidad con proteína A recombinante unida en un solo punto de gran capacidad; las modificaciones en la secuencia de aminoácidos introducidas en tal proteína A recombinante con respecto a la proteína A tipo salvaje de longitud completa, contribuyen considerablemente también a la pérdida creciente de proteína.

5. Comparación paralela de métodos: Comparación con el método de Milles (US 4,983,722)

35 La patente de Milles (No: 4,983,722) reivindica que la DEAE Sepharose de unión, utilizada como segundo paso cromatográfico, con un gradiente de sal (NaCl 0.025 M a 0.25 M) para la elución, pueden reducir el contenido lixiviado de proteína A en el eluato hasta menos de 15 ng/mg de anticuerpo (el rango de proteína A fue de 0.9 a 14 ng/mg de anticuerpo).

TABLA 2

Comparación de los residuos de proteína A en muestras de eluatos del anticuerpo 6A1 purificado en matrices de afinidad con proteína A unidas por un solo o por múltiples puntos		
Matriz	Muestra	Niveles de Proteína A (ng/mg)
rProtein A Sepharose (unida por un solo punto)	Eluato de Proteína A	20.2
rmp ProteinA Sepharose (unida por múltiples puntos)	Eluato de Proteína A	2.16
Native ProteinA Sepharose 4FF (unida por múltiples puntos)	Eluato de Proteína A	< 2.0

65 El objetivo de estos experimentos fue confirmar estos resultados usando MabSelect (nueva matriz de proteína A recombinante, de un solo punto de unión) con un anticuerpo de pi más bajo (pi 6.5-7.5), y comparar directamente el método de no unión en Q-Sefarosa (que utiliza diversos buffers de equilibrio/carga) con el método de la patente de Milles.

ES 2 288 252 T3

Método aplicado

La purificación del anticuerpo 6A1 (pi 6.5-7.5) incluyó dos pasos cromatográficos que consistieron en el paso de cromatografía con MabSelect proteína A seguido por un paso de cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sefarosa (no unión), o un paso de cromatografía en DEAE Sepharose (unión). Ver L0 9007 y L0 9375.

Cromatografía de MabSelect Protein A

10	Matriz de la Columna	MabSelect recombinant Protein A
	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 15 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	30 ml
15	Velocidad de Flujo Operacional	500 cm/hr (16.80 ml/min)
	Limpieza	6 M Guanidina HCl (2 volúmenes de columna)
20	Capacidad de Carga	35 mg/ml de matriz
	Equilibración	50 mM glicina/glicinato pH 8.0/250 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
25	Lavado post carga	50 mM glicina/glicinato pH 8.0/250 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
	Buffer de elución	100 mM glicina pH 3.50 (6 volúmenes de columna)
30	Lavado	100 mM ácido cítrico pH 2.1 (2 volúmenes de columna)

El sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo 6A1, fue purificado en una columna de MabSelect (30 ml), conectada a un sistema de AKTA FPLC. Las condiciones usadas fueron según lo descrito en la tabla anterior. El anticuerpo fue eluido usando 0.1 M glicina pH 3.5. Siguiendo a la elución, el pH del eluato fue ajustado a un pH 7.0, y entonces la muestra del eluato fue dividida en 5 alícuotas; cada alícuota fue entonces diafiltrada en un buffer diferente para la cromatografía de intercambio aniónico. La primera alícuota fue diafiltrada en 50 mM de Tris HCl pH 8/75 mM NaCl para la corrida 1 de la cromatografía de Q-Sefarosa. La segunda alícuota fue diafiltrada en 50 mM de Tris HCl pH 8/100 mM NaCl para la corrida 2 de la cromatografía en Q-Sefarosa. La tercera alícuota fue diafiltrada en 20 mM de fosfato de sodio pH 6.5/80 mM de NaCl para la corrida 3 de cromatografía en Q-Sefarosa. A las alícuotas cuatro y cinco se les intercambiaron los buffers en 25 mM TrisHCl pH 8.0/25 mM NaCl para la evaluación del método de unión en DEAE Sefarosa descrito en patente de Milles. La diferencia entre las corridas 4 y 5 es que en la corrida 4 el pico principal fue colectado como una fracción y ésta fue diafiltrada en buffer fosfato salino estándar antes del análisis, mientras que en la corrida 5, el pico de elución fue fraccionado y dializado en un buffer fosfato preparado según lo descrito en la patente de Milles. Las condiciones para cada una de las cinco corridas de columna son descritas debajo:

Cromatografía de Q-Sefarosa: Corrida 1

50	Matriz de la Columna	Q-Sepharose Fast Flor
	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 8 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	16 ml
55	Preparación de la Columna	Empacada en 0,1 M de Hidróxido de Sodio a 150 cm/h
	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
60	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
	Capacidad de Carga	15 mg/ml de matriz
65	Equilibración	50 mM TrisHCl pH 8.0/75 mM NaCl (8 volúmenes de columna)

ES 2 288 252 T3

	Lavado post carga	50 mM TrisHCl pH 8.0/75 mM NaCl (5 volúmenes de columna)
	Buffer de Strip	Cloruro de Sodio 2 M (2 volúmenes de columna)
5	Lavado	Hidróxido de Sodio 0.1 M (2 volúmenes de columna)
 <i>Cromatografía de Q-Sepharosa: Corrida 2</i>		
10	Matriz de la Columna	Q-Sepharose Fast Flor
	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 8 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	16 ml
15	Preparación de la Columna	Empacada en 0,1 M de Hidróxido de Sodio a 150 cm/h
	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
20	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
	Capacidad de Carga	7.5 mg/ml de matriz
25	Equilibración	50 mM TrisHCl pH 8.0/100 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
	Lavado post carga	50 mM TrisHCl pH 8.0/100 mM NaCl (5 volúmenes de columna)
	Buffer de Strip	Cloruro de Sodio 2 M (2 volúmenes de columna)
30	Lavado	Hidróxido de Sodio 0.1 M (2 volúmenes de columna)
 <i>Cromatografía de Q-Sepharosa: Corrida 3</i>		
35	Matriz de la Columna	Q-Sepharose Fast Flor
	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 8 cm de altura del lecho
40	Volumen de la Columna	16 ml
	Preparación de la Columna	Empacada en 0,1 M de Hidróxido de Sodio a 150 cm/h
45	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
50	Capacidad de Carga	7.5 mg/ml de matriz
	Equilibración	20 mM Fosfato de Sodio pH 6.5/80 mM NaCl
	Lavado post carga	20 mM Fosfato de Sodio pH 6.5/80 mM NaCl(5 volúmenes de columna)
55	Buffer de Strip	Cloruro de Sodio 2 M (2 volúmenes de columna)
	Lavado	Hidróxido de Sodio 0.1 M (2 volúmenes de columna)
60	<i>DEAE-Sepharosa: Corrida 4</i>	
	Matriz de la Columna	DEAE Sepharose
65	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 8 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	16 ml

ES 2 288 252 T3

5	Preparación de la Columna	Empacada en buffer de equilibrio a 150 cm/h
	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
	Capacidad de Carga	7.5 mg/ml de matriz
10	Equilibración	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl(8 volúmenes de columna)
	Lavado post carga	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl(5 volúmenes de columna)
15	Buffer de Elución	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl a 25 mM TrisHCl pH 8.6/250 mM NaCl (10 volúmenes de columna)
	Lavado	Cloruro de Sodio 2 M (2 volúmenes de columna)
20	<i>Método de unión a DEAE Sepharose: Corrida 5 (Método de Milles)</i>	
	Matriz de la Columna	DEAE Sepharose
25	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 8 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	16 ml
	Preparación de la Columna	Empacada en buffer de equilibrio a 150 cm/h
30	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
35	Capacidad de Carga	7.5 mg/ml de matriz
	Equilibración	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl(8 volúmenes de columna)
40	Lavado post carga	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl(5 volúmenes de columna)
	Buffer de Elución	25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl a 25 mM TrisHCl pH 8.6/250 mM NaCl (10 volúmenes de columna)
45	Lavado	Cloruro de Sodio 2 M (2 volúmenes de columna)

Las propiedades de los diversos buffers utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 3. Los perfiles de elución para cada una de las corridas de cromatografía de intercambio aniónico se muestran en las figuras 2-5.

50 Las muestras de eluato generadas a partir de las 5 corridas de intercambio iónico, fueron ensayadas para los niveles de proteína A en el ELISA rPA. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

55

60

65

ES 2 288 252 T3

TABLA 3

Buffers usados en este estudio

Buffers usado en este estudio				
Buffer de Equilibrio	Número de Corrida	Conductividad (ms/cm)	Resina	pH
50 mM TrisHCl pH 8.0/75 mM NaCl	1	10.74	Q-Sepharose (No unión)	8.00
50 mM TrisHCl pH 8.0/100 mM NaCl	2	12.85	Q-Sepharose (No unión)	8.01
20 mM Fosfato de Sodio pH 6.5/80 mM NaCl	3	10.20	Q-Sepharose (No unión)	6.50
25 mM TrisHCl pH 8.6/25 mM NaCl	4/5	3.35	DEAE-Sepharose (Unión)	8.60
25 mM TrisHCl pH 8.6/250 mM NaCl*	4/5	24.54	DEAE-Sepharose (Unión)	8.61

* Gradiente del buffer de elución

Las fracciones a través del perfil de elución de la corrida 5 en DEAE-Sepharose (método de Milles) fueron colectadas y analizadas en ELISA de Proteína A recombinante; los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 4

Resultados del ELISA de proteína A recombinante

ID de la Muestra	Niveles de Proteína A recombinante (ng/mg)	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	% de Recuperación	Volúmenes de Elución (CV' s) *
Eluato de Q-Sepharosa Corrida 1	< 0.4	1.42	82	4.5
Eluato de Q-Sepharosa Corrida 2	2.94	1.49	70	3.5
Eluato de Q-Sepharosa Corrida 3	0.73	1.86	85	3.4
Combinación de eluatos de DEAE Sepharosa Corrida 4 (Combinación de todas las fracciones)	1.72	2.16	75	2.5
Combinación de eluatos de DEAE Sepharosa Corrida 5 (Combinación de las fracciones 2 a 6)	1.55	1.83	73	3

* Donde CV's significa los volúmenes de las columnas

ES 2 288 252 T3

TABLA 5

Niveles de proteína A recombinante en las fracciones de eluato a través del pico de elución obtenido durante la separación de la DEAE-Sefarosa de unión (Método de Milles); Corrida 5

5

Número de Fracción	Niveles de Proteína A recombinante (ng/mg)	Absorbancia (A ₂₈₀)
1	3.33	0.018
2	0.4	0.108
3	0.4	0.22
4	0.4	0.169
5	2.01	0.092
6	16.7	0.042
7	6.38	0.016

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La recuperación más alta (85%) y la mejor separación de proteína A recombinante para este anticuerpo (6A1; pi 6.5- 7.5) fueron obtenidos bajo condiciones de no unión en Q-Sefarosa, usando 20 mM de buffer fosfato de sodio pH 6.5/80 mM NaCl (correspondiente a la corrida 3). La corrida 1 también mostró buena recuperación (82%) y separación de proteína A recombinante sin embargo, el volumen de elución para esta corrida fue significativamente más alto que lo esperado para un método de no unión; sugiriendo un retraso parcial del anticuerpo en la columna en este sistema de buffer. El aumento de la concentración de NaCl (corrida 2) resultó en una separación menor de la proteína A recombinante, por lo tanto el sistema de buffer usado en la corrida 3, fue el más apropiado para este anticuerpo. Ha sido nuestra observación anterior que el sistema de buffer utilizado en la corrida 1 es más apropiado para los anticuerpos de pi elevados y el utilizado en la corrida 3 es particularmente útil para los anticuerpos neutros y ligeramente ácidos. Estos experimentos fueron hechos a capacidades similares (7.5 mg/ml resina) por que esperaríamos poder utilizar este método de no unión en capacidades mucho más altas (> 30 mg/ml). Esperaríamos que este método de no unión fuera aplicable a muchos intercambiadores de aniónicos, por ejemplo Q-Hyper D además para adsorbentes de membrana de intercambio aniónico (tales como Mustang Q, Intercept Q y Sartobind Q). También esperaríamos que este proceso fuera más aplicable a la producción a gran escala comparado con el método de Milles, como que mayores capacidades se pueden aplicar.

En el caso de la corrida 5 (método de Milles), se observó el fraccionamiento de la proteína A recombinante, a través del pico de elución principal según las indicaciones de la Tabla 5. La combinación cuidadosa de las fracciones, por lo tanto, se requiere para asegurar la buena separación de la proteína A recombinante. Esto tuvo un impacto en la recuperación (73%) y aún en este caso, no dio como buena separación según se obtuvo con el método de no unión. Para el método de Milles, por lo tanto, es más difícil alcanzar buena separación y alta recuperación para líneas celulares/anticuerpos, en casos donde se observe muy alta pérdida (tal como la obtenida comúnmente con las matrices unidas en solo punto).

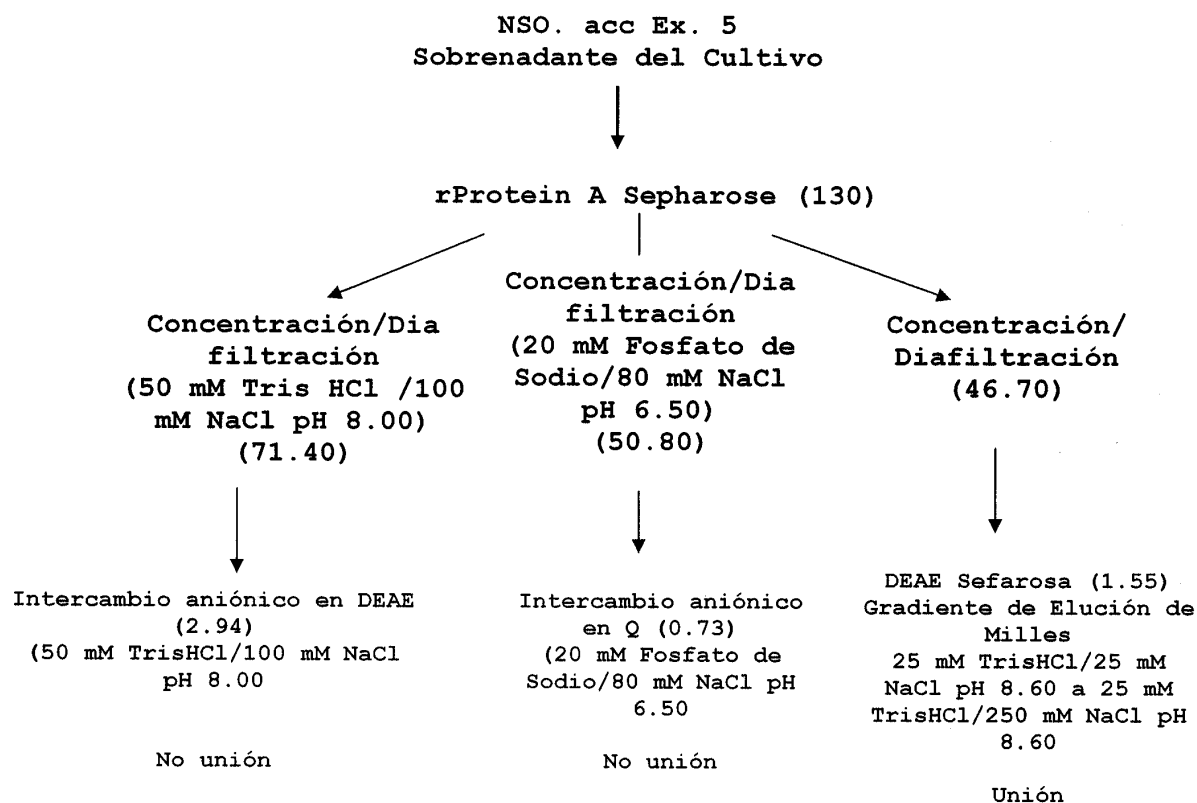
Los datos observados a partir de la corrida 5 son representativos de las condiciones descritas en la patente de Milles. Una visión general de las comparaciones de los métodos y de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 6, debajo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 288 252 T3

TABLA 6

Resumen de los niveles de proteína A recombinante en diferentes etapas de la purificación del anticuerpo



**Todos los ejemplos llevados a cabo con 7.5 mg/ml de carga de intercambios o*

15 mg/ml de capacidad de carga:

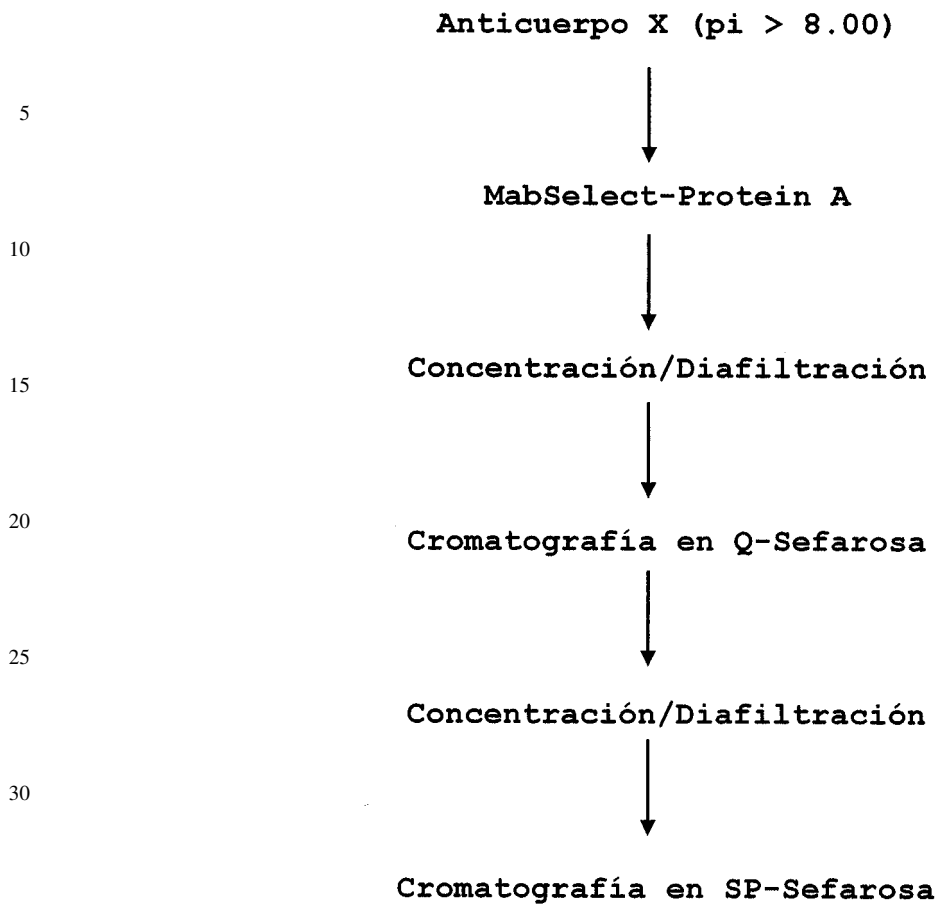
Concentración y Diafiltración
(50 mM TrisHCl pH 8.0/75 mM NaCl)
&
Intercambio Aniónico Q (<0.4)
(50 mM TrisHCl pH 8.0/75 mM NaCl)

Nota: Los niveles de proteína A recombinante se muestran entre paréntesis (ng/ml); notar que no todos los sobrenadantes de las líneas celulares NSO clónicas, dan niveles similares de contaminación de proteína A.

6. Purificación de un anticuerpo de elevado pi

Un anticuerpo de elevado pi (pi 9.0-9.3) fue purificado usando Cromatografía de Afinidad con Proteína A (matriz MabSelect-Proteína A recombinante unida por un solo punto), seguida por cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sefarosa (bajo condiciones de no unión; para remover las trazas contaminantes) seguido por cromatografía de intercambio catiónico en SP-Sefarosa (bajo condiciones de unión para eliminar los agregados).

ES 2 288 252 T3



40 *Materiales y los métodos experimentales*

Cromatografía de MabSelect Protein A

Matriz de la Columna	MabSelect recombinant Protein A (Proteína A recombinante unida por un solo punto)
45 Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 15 cm de altura del lecho
Volumen de la Columna	30 ml
50 Velocidad de Flujo Operacional	500 cm/hr (16.80 ml/min)
Limpieza	6 M Guanidina HCl (2 volúmenes de columna)
55 Capacidad de Carga	35 mg/ml de matriz
Equilibración	50 mM glicina/glicinato pH 8.0/250 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
Lavado post carga	50 mM glicina/glicinato pH 8.0/250 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
60 Buffer de elusión	100 mM glicina pH 3.50 (6 volúmenes de columna)
Lavado	100 mM ácido cítrico pH 2.1 (2 volúmenes de columna)

65 El sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo de elevado p_i fue purificado en una columna de afinidad MabSelect Proteína A (30 ml), conectada a un sistema AKTA FPLC. Las condiciones usadas fueron según lo descrito en la tabla anterior. El anticuerpo fue eluido usando glicina 0.1 M pH 3.5. Después de la elución, el eluato fue man-

ES 2 288 252 T3

tenido en un pH 3.69 (no se requirió ajuste) por 60 minutos (paso a bajo pH para la inactivación de virus), y después se neutralizó a pH 8 usando Tris Base 2. Se realizaron tres ciclos sobre proteína A; la recuperación del producto fue determinada por A280 nanómetro y se muestra en la Tabla 7 para cada ciclo.

5

TABLA 7

Recuperación sobre una columna MabSelect Proteína A

10

Número de Ciclo	% de Recuperación
1	81
2	81
3	80

15

20

25

Después de cromatografía en MabSelect Proteína A, los eluatos provenientes de cada uno de los tres ciclos fueron combinados y el buffer intercambiado a 25 mM Tris pH 8.0 (buffer de equilibrio para Q-Sefarosa) usando un concentrador celular Amicon agitado, equipado con una membrana Millipore de 10 kDa.

30

Cromatografía de Q-Sefarosa

Matriz de la Columna Q-Sepharose Fast Flor

35

Dimensiones de la Columna 1.6 cm de diámetro interno x 15 cm de altura del lecho

Volumen de la Columna 30 ml

40

Preparación de la Columna Empacada en 0,1 M de Hidróxido de Sodio a 225 cm/h

Velocidad de Flujo Operacional 150 cm/hr (5.0 mL/min)

45

Limpieza 0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)

Capacidad de Carga 40 mg/ml de matriz Equilibración 20 mM Tris pH 8.0 (8 volúmenes de columna)

Lavado post carga 20 mM Tris pH 8.0 (5 volúmenes de columna)

50

Buffer de Strip 20 mM Tris pH 8.0/2M NaCl (2 volúmenes de columna)

Lavado Hidróxido de Sodio 0.1 M (2 volúmenes de columna)

55

40 ml del eluato concentrado/diafiltrado proveniente de la cromatografía MabSelect-Proteína A fue cargado en una columna de Q-Sefarosa con una capacidad de carga de 40 mg/ml de matriz. La columna fue operada en un modo de no unión y la fracción no unida que contenía el anticuerpo fue colectada. La recuperación en este paso fue de aproximadamente el 69% por A₂₈₀. Esto es ligeramente inferior que lo obtenido bajo estas condiciones para este anticuerpo, y puede debido a una estimación inexacta del volumen de la carga debido a sostener el volumen en la bomba de la muestra de FPLC.

60

Siguiendo la cromatografía de Q-Sefarosa, la fracción no unida fue concentrada hasta 13.98 mg/ml y diafiltrada en buffer de equilibrio en SP-Sefarosa (25 mM acetato de sodio pH 5.0/25 mM NaCl) usando un concentrador celular Amicon agitado, equipado con una membrana Millipore de 10 kDa.

65

ES 2 288 252 T3

Cromatografía de SP-Sefarosa

	Matriz de la Columna	Q-Sepharose Fast Flor
5	Dimensiones de la Columna	1.6 cm de diámetro interno x 15 cm de altura del lecho
	Volumen de la Columna	30 ml
	Preparación de la Columna	Empacada en 0,1 M de Hidróxido de Sodio a 150 cm/h
10	Velocidad de Flujo Operacional	100 cm/hr (3.35 mL/min)
	Limpieza	0,1 M de Hidróxido de Sodio (2 volúmenes de columna)
15	Capacidad de Carga	10 mg/ml de matriz
	Equilibración	25 mM Acetato de Sodio pH 5/25 mM NaCl (8 volúmenes de columna)
20	Lavado post carga	25 mM Acetato de Sodio pH 5/25 mM NaCl (6 volúmenes de columna)
	Elusión	25 mM Acetato de Sodio pH 5/186 mM NaCl (25 volúmenes de columna)
	Buffer de Strip	25 mM Acetato de Sodio pH 5/2 mM NaCl (2 volúmenes de columna)
25	Lavado	Hidróxido de Sodio 0.1 M (2 volúmenes de columna)

30 24 ml del eluato de la Q-Sefarosa con el buffer intercambiado, fue cargado sobre una columna de SP-Sefarosa con una capacidad de carga de 10 mg/ml de matriz. La columna fue operada en un modo de unión; el eluato fue colectado como fracciones. Las fracciones, a través del perfil de elución, fueron analizadas por GP-HPLC para determinar los resultados de los niveles de agregados y se muestran en la Tabla 8. Las muestras después de cada paso de cromatográfico, fueron colectadas y analizado para los residuos de proteína A recombinante, los resultados se presentan en la Tabla 9.

TABLA 8

Resultados del ELISA de proteína A recombinante después de cada paso cromatográfico

ID de la Muestra	Niveles de Proteína A recombinante (ng/mg)	Concentración de anticuerpo (mg/ml)
Eluato de MabSelect-Proteína A (después de conc/diaf)	2.64	46.7
Eluato de Q-Sefarosa	< 4	8.10
Combinación de los eluatos de SP-Sefarosa F (1-16)	< 4	1.79

ES 2 288 252 T3

TABLA 9

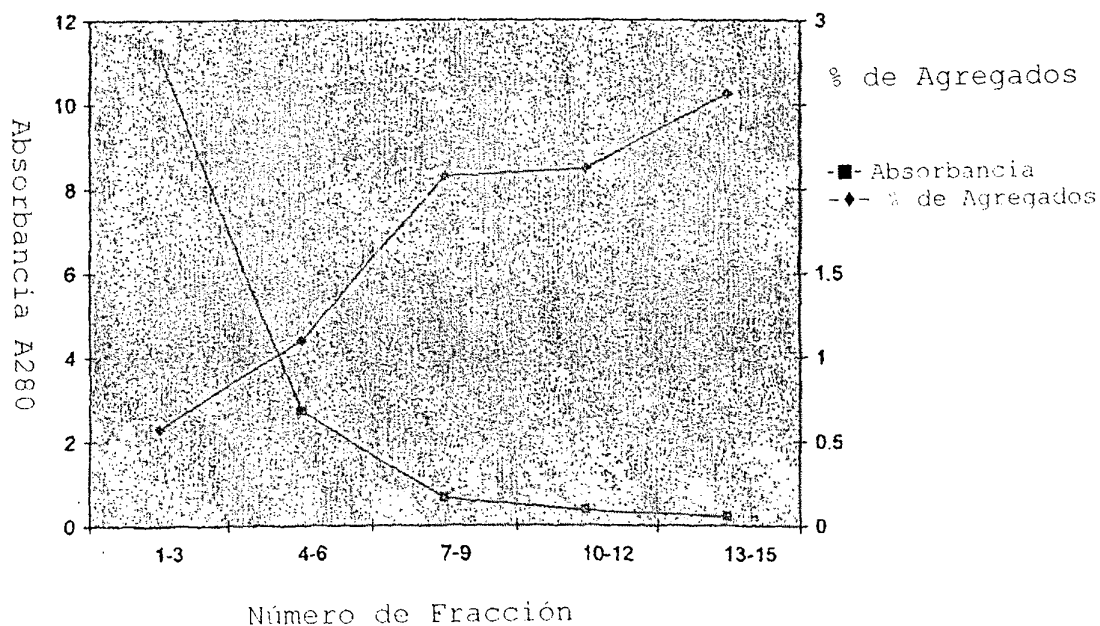
Análisis de GP-HPLC de las fracciones de SP-Sefarosa

ID de la Muestra	% de Agregados	Absorbancia (A ₂₈₀)
Combinación de eluatos de SP F (1-3)	0.57	11.2
Combinación de eluatos de SP F (4-6)	1.10	2.7
Combinación de eluatos de SP F (7-9)	2.07	0.665
Combinación de eluatos de SP F (10-12)	2.12	0.351
Combinación de eluatos de SP F (13-15)	2.56	0.208

Conclusión: El fraccionamiento de los agregados fue observado durante el paso de elución del pico de anticuerpo; ver la Tabla 4. Con las fracciones enriquecidas de agregados, eluyendo adicionalmente (en el extremo de la cola del pico de elución) se comparó con las fracciones que no contenían agregados. Las fracciones de la cola se pueden omitir de la combinación principal para obtener una combinación de fracciones 99% monomérica y aún tiene un alto % de recuperación (> 95%).

TABLA 4

Fraccionamiento de los agregados a través del pico de elución en SP-Sefarosa para un anticuerpo de elevado pi



REIVINDICACIONES

1. Método de purificar un anticuerpo, que comprende los pasos de:

- a) purificar un anticuerpo por medio de cromatografía de afinidad con proteína A,
- b) cargar el anticuerpo purificado que comprende una proteína A contaminante, donde dicha proteína A contaminante se obtiene luego de eluir el anticuerpo unido proveniente de dicha columna de cromatografía de afinidad con proteína A en un material de intercambio aniónico bajo condiciones que permiten la unión de la proteína A y cuyas condiciones resulten en la retención del anticuerpo en el flujo continuo, mientras que la proteína A contaminante es unida, y así removerla del anticuerpo, y
- c) colectar al menos el 70% de la cantidad de anticuerpo cargado sobre el material de intercambio aniónico en el flujo continuo del intercambiador iónico, mientras que una proteína A contaminante se une al material de intercambio iónico.

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el método comprende, después del primer paso de intercambio aniónico, el paso de purificación adicional de dicho anticuerpo, preferiblemente permitiendo la remoción del anticuerpo agregado.

3. El método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el método comprende el paso de purificación adicional de dicho anticuerpo, preferiblemente permitiendo la remoción del anticuerpo agregado.

4. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proteína A es una proteína A que comprende al menos una parte de un dominio de unión a la IgG funcional de la proteína A tipo salvaje, seleccionado a partir de los dominios naturales E, D, A, B, C o muteínas obtenidas por ingeniería genética de ésta, las cuales retiene la funcionalidad para la unión a la IgG, y donde dicha proteína A se **caracteriza** por una constante de unión de al menos $K=10^{-8}$ M para la porción Fc de la IgG1 humana o la IgG2a de ratón.

5. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proteína A es una proteína A recombinante comprende una cisteína en los últimos 30 aminoácidos del C-terminal de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína A recombinante y es acoplada al material del soporte cromatográfico a través del átomo de azufre de dicho residuo cisteína vía un enlace tioéter como un único punto de unión.

6. El método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la proteína A o la proteína A contaminante se reduce a una concentración < 1 ng/mg de IgG en el flujo continuo del intercambiador iónico.

7. El método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el anticuerpo tiene un pI de al menos 6.5 o por encima.

8. El método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo IgG donde el anticuerpo IgG puede ser anticuerpo quimérico o una IgG con las CDR injertadas.

9. El método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el anticuerpo IgG está en aquellas porciones del anticuerpo que son relevantes para la unión a la proteína A, preferiblemente en su porción Fc que es relevante para la unión a la proteína A, más preferiblemente en la región interfaz C γ 2-C γ 3 de la IgG que comprende los sitios de unión para la proteína A de tal especie de origen y de origen de la subclase de IgG cuyos orígenes permitan para la unión de alta afinidad para la proteína A.

10. El método según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el anticuerpo IgG se selecciona del grupo que consiste de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas con respecto a la porción de Fc del anticuerpo.

11. El método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el anticuerpo es colectado a partir de un cultivo celular antes de purificarlo por medio de cromatografía de afinidad con proteína A.

12. El método según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el anticuerpo es colectado a partir de un cultivo de células de mamíferos.

13. El método según las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizado** porque el anticuerpo a ser purificado por cromatografía de afinidad con proteína A no es tratado para inactivar las proteasa, preferiblemente no es mezclado con al menos un inhibidor de proteasa.

14. Método de purificar un anticuerpo que comprende los pasos de:

- a) purificar un anticuerpo por medio de cromatografía de afinidad con proteína A,

ES 2 288 252 T3

- 5
- b) cargar el anticuerpo purificado que comprende una proteína A contaminante, donde dicha proteína A contaminante se obtiene luego de eluir el anticuerpo unido proveniente de dicha columna de cromatografía de afinidad con proteína A sobre un primer material de intercambio aniónico bajo condiciones que permiten la unión de la proteína A y cuyas condiciones resulten en la retención del anticuerpo en el flujo continuo, mientras que la proteína A contaminante es unida, y así removerla del anticuerpo,
 - c) colectar el anticuerpo cargado sobre el material de intercambio aniónico en el flujo continuo del intercambiador iónico, mientras que una proteína A contaminante se une al material de intercambio iónico, y
 - 10 d) purificar adicionalmente el anticuerpo mediante su carga en, unión a y elución de este a partir de un segundo intercambiador iónico.

15 15. El método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque al menos el 70% de la cantidad de anticuerpo cargado en el material del primer intercambiador aniónico se recupera en el flujo continuo.

16. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el anticuerpo tiene un pI de al menos 7.5 o por encima.

20 17. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el segundo intercambiador iónico es un intercambiador catiónico.

18. El método según las reivindicaciones 14 o 17 **caracterizado** porque el anticuerpo purificado es un anticuerpo monomérico y el segundo paso de intercambio iónico permite la remoción del anticuerpo agregado.

25 19. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

30

35

40

45

50

55

60

65

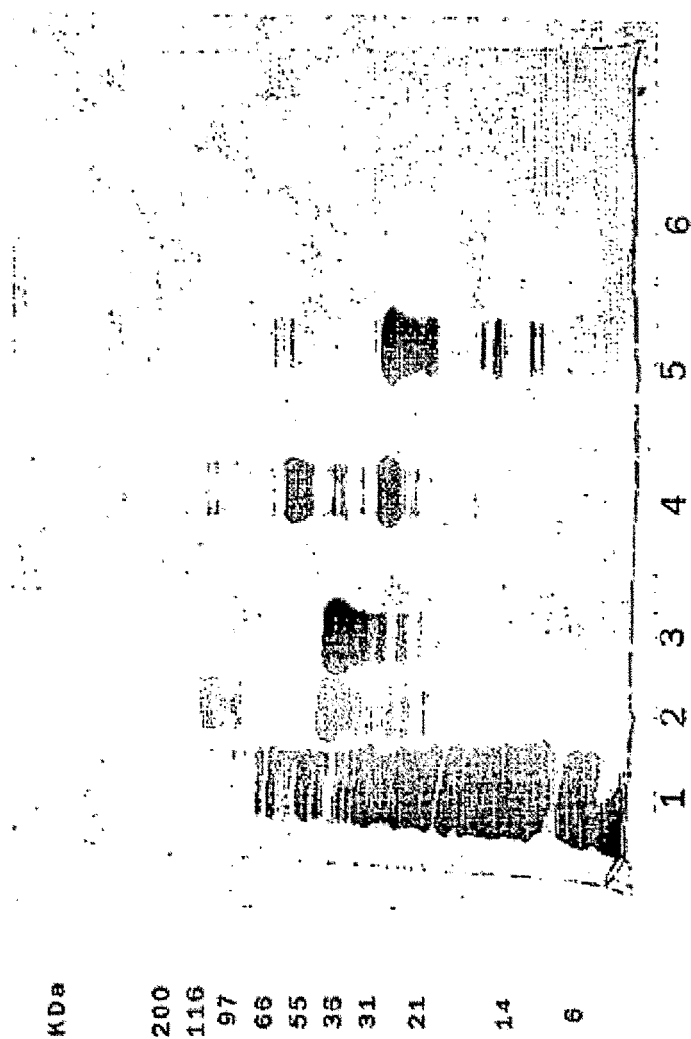
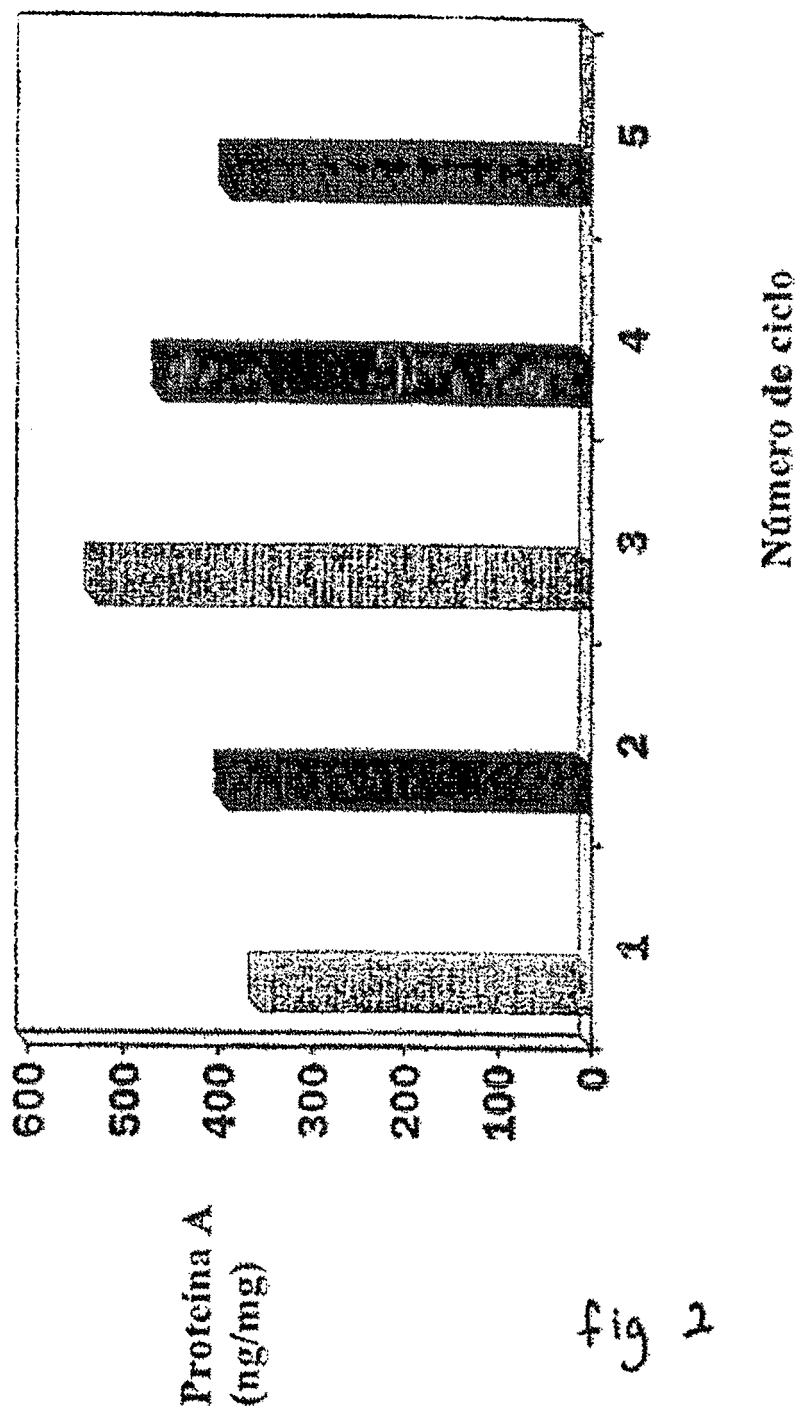
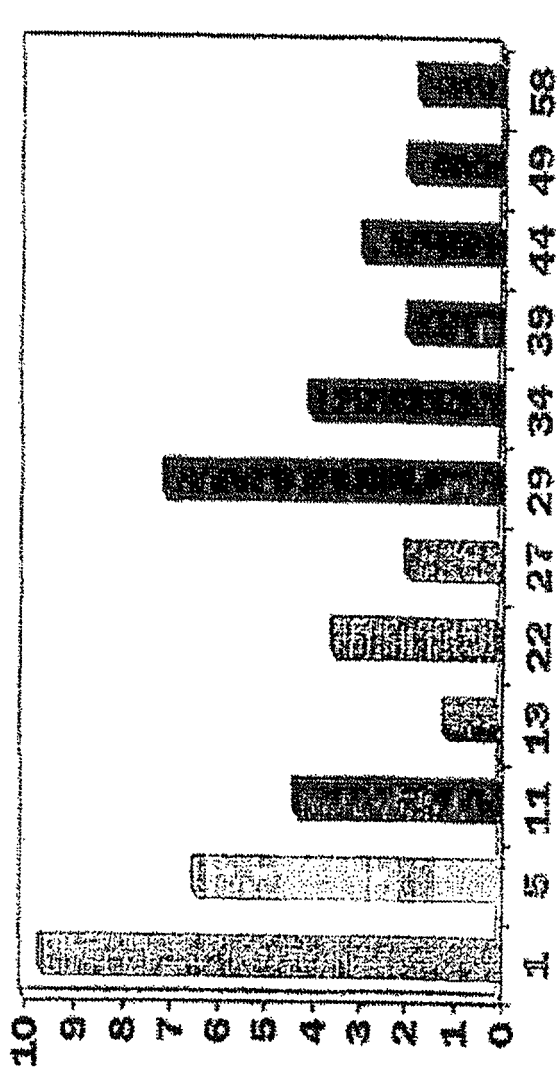


fig 1





Proteína A
(ng/mg de
anticuerpo)

Número de Ciclo en la Columna de Afinidad con Proteína A

Fig 3