

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

(21) **PI0610201-8 A2**

(22) Data de Depósito: 23/05/2006
(43) Data da Publicação: 01/06/2010
(RPI 2056)



* B R P I 0 6 1 0 2 0 1 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*

C07K 16/00

G01N 30/34

C07K 1/18

(54) Título: **MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS**

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2005 EP 05 011302.6

(73) Titular(es): F Hoffmann-La Roche AG

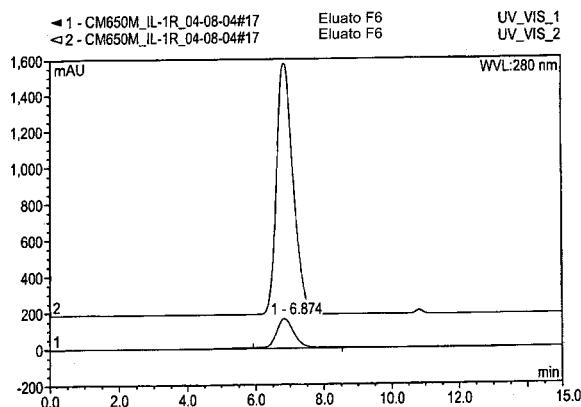
(72) Inventor(es): BURKARD KOLB, MARIA SEBALD, ROBERTO FALKENSTEIN

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006004863 de 23/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/125599 de 30/11/2006

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a método para a purificação de imunoglobulinas através de cromatografia de troca de íon que é descrito. O método cromatográfico usa uma resina de troca de íon fraca e um processo de eluição de etapa única para a purificação de uma imunoglobulina. Adicionalmente um método para a determinação da concentração de sal para a eluição de etapa única de uma imunoglobulina a partir de uma resina de troca de íon é descrito.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo de purificação de polipeptídeo. Um novo método para a purificação de imunoglobulinas com uma resina de troca de íon é descrito aqui. Ao mesmo tempo um método para a determinação rápida de condições de purificação é dado.

Antecedentes da Invenção

Proteínas e especialmente imunoglobulinas desempenham um papel importante no portfolio médico de hoje. Para aplicação humana cada substância terapêutica tem que satisfazer critérios distintos. Para assegurar a segurança de agentes biofarmacêuticos a seres humanos, ácidos nucléicos, vírus e proteínas de célula hospedeiro, que causariam dano severo, têm que ser removidos especialmente. Para satisfazer a especificação reguladora uma ou mais etapas de purificação têm que seguir o processo de fabricação. Dentre outros, pureza, produtividade total e rendimento desempenham um papel importante na determinação de um processo de purificação apropriado.

Métodos diferentes são bem estabelecidos e amplamente usados para purificação de proteína, tal como cromatografia por afinidade com proteínas microbianas (por exemplo, cromatografia de afinidade de proteína A ou proteína G), cromatografia de troca de íon (por exemplo, troca de cátion (resinas de carboximetila), troca de ânion (resinas de amino etila) e troca de modo misto), absorção tiofílica (por exemplo, com beta-mercaptoetanol e outros ligantes SH), cromatografia de interação hidrofóbica ou de absorção aromática (por exemplo, com fenil-sepharose, resinas aza-arenofílicas ou ácido m-aminofenilborônico), cromatografia de afinidade com quelato de metal (por exemplo, com material de afinidade de Ni(II) e Cu(II), cromatografia de exclusão de tamanho e métodos eletroforéticos (tal como eletroforese de gel, eletroforese capilar) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Necina, R. e outros, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 689-698, des-

creveram a captura de anticorpos monoclonais humanos diretamente a partir de sobrenadante de cultura através de meios de troca de íon exibindo densidade de carga alta. No WO 89/05117 é descrito um método para a purificação de imunoglobulinas produto submetendo diretamente o meio de cultura celular a um tratamento com troca de cátion. Uma purificação em uma etapa de anticorpos IgG monoclonais de ascites de camundongo é descrita por Danielsson, A. e outros, *J. Immun. Meth.* 115 (1988), 79-88.

Uma combinação de métodos, isto é, uma precipitação de ácido caprílico e cromatografia de troca de íon, foi usada por Raweerith, R. e outros (*J. Immun. Meth.* 282 (2003) 63-72) como meio para fracionar anticorpo de antídoto de cavalo digerido com pepsina $F(ab')_2$. No WO 2003/102132 a combinação de uma etapa de purificação de não-afinidade e uma filtragem de fluxo tangencial de alto desempenho é descrito para a purificação de proteínas. A combinação de duas etapas de cromatografia de afinidade é relatada no WO 92/19973.

Follman, D.K. e Fahrner, R.L. relataram uma avaliação fatorial de processos de purificação de anticorpo usando três etapas de cromatografia sem proteína A (*J. Chrom. A* 1024 (2004) 79-85). Mhatre, R. e outros, (*J. Chrom. A* 707 (1995) 225-231) exploraram a purificação de anticorpo de fragmentos Fab através de cromatografia de troca de cátion e eluição com gradiente de pH.

O WO 94/00561 relata anticorpos anti-*rhesus* monoclonais humanos e linhagens de célula produzindo os mesmos. Um método para purificação de um polipeptídeo através de cromatografia de troca de íon é relatado no WO 2004/024866 onde uma lavagem de gradiente é usada para separar um polipeptídeo de interesse de um ou mais contaminantes. Schwarz, A. e outros (*Laborpraxis* 21 (1997) 62-66) relatam a purificação de anticorpos monoclonais com uma coluna CM-HyperD.

O WO 2004/076485 relata um processo para purificação de anticorpo através de cromatografia de proteína A e troca de íon. Na EP 0 530 447 um processo para purificação de anticorpos monoclonais IgG através de uma combinação de três etapas cromatográficas é relatado. A remoção de

proteína A de preparações de anticorpo é relatada na US 4.983.722.

O WO 95/16037 relata a purificação de anticorpos monoclonais biespecíficos anti-EGF-R/anti-CD3 a partir de hibridoma híbrido realizada através de uma cromatografia de troca de cátion de proteína A. A separação de monômeros de anticorpo de seus multímeros através do uso de cromatografia de troca de íon é relatada na EP 1 084 136. A US 5.429.746 refere-se à aplicação de cromatografia de combinação de cromatografia de interação hidrofóbica para a purificação de proteínas de molécula de anticorpo.

Sumário da Invenção

10 Deste modo é o objetivo da presente invenção prover um outro método para a purificação de imunoglobulinas recombinantemente produzidas e para a separação de espécies de imunoglobulina monoméricas e multimericas.

15 A presente invenção provê um método para purificação de uma imunoglobulina, onde o método compreende as etapas que seguem:

a) provisão de uma solução compreendendo uma imunoglobulina, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

20 b) trazer a solução e um material de troca de íon fraco em contato sob condições com o que a imunoglobulina se liga ao material de troca de íon fraco;

c) recuperação da imunoglobulina a partir do material de troca de íon fraco em uma etapa única usando uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal.

25 A invenção provê ainda um método para determinação da concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única, compreendendo as duas etapas que seguem:

a) uma etapa compreendendo as subetapas que seguem:

30 a1) provisão de uma solução compreendendo um polipeptídeo, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

a2) trazer uma primeira alíquota da solução contendo o polipeptídeo e o material de troca de íon em contato sob condições com o que o

polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;

a3) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso de uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal com o que a concentração do sal é aumentada linearmente;

5 a4) determinação da concentração de partida do sal onde a primeira fração do polipeptídeo começa a eluir a partir da coluna de troca de íon;

b) etapa dois compreendendo as subetapas que seguem

10 b1) trazer uma segunda alíquota da solução contendo o polipeptídeo e o material de troca de íon em contato sob condições com o que o polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;

b2) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso de um método de eluição de três etapas, através do que

15 i) a concentração de sal da primeira etapa de eluição é calculada como a soma do produto da concentração de partida do sal conforme determinado na etapa a4) e do número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal

e

20 do produto da concentração do sal de tampão e do número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal tampão;

ii) a concentração de sal da segunda etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,25 e 1,35;

25 iii) a concentração de sal da terceira etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,50 e 1,70;

30 com o que os fatores das etapas ii) e iii) são determinados como segue: em uma concentração de partida entre 10 mM e 40 mM os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em uma concentração de partida entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60, respectivamente, e em uma concentração de partida de mais de 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50, respectivamente.

- b3) determinação em qual subetapa do método de eluição de três etapas da etapa b2) o polipeptídeo é eluído a partir da coluna de troca de íon deste modo determinando a concentração do sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única.

Descrição Detalhada da Invenção

Esses termos são usados no presente pedido de acordo com a definição que segue:

- O termo "resina de troca de íon" ou "material de troca de íon" conforme usado no presente pedido significa uma matriz de peso molecular alto imóvel que carrega substituintes carregados covalentemente ligados. Para neutralidade de carga geral contra-íons não-covalentemente ligados são ligados a ela. O "material de troca de íon" tem a habilidade em trocar seus contra-íons não-covalentemente ligados por íons similarmente carregados da solução circundante. Dependendo da carga de seus contra-íons permutáveis a "resina de troca de íon" é referida como uma resina de troca de cátion ou como resina de troca de ânion. Dependendo da natureza do grupo carregado (substituinte) a "resina de troca de íon" é referida como, por exemplo, no caso de resinas de troca de cátion, resina de ácido sulfônico (S) ou resina de carboximetila (CM). Dependendo da natureza química do grupo/substituinte carregado a "resina de troca de íon" pode adicionalmente ser classificada como resina de troca de íon forte ou fraca, dependendo da resistência do substituinte carregado covalentemente ligado. Por exemplo, resinas de troca de cátion forte têm um grupo de ácido sulfônico como substituinte carregado, resinas de troca de cátion fraca têm um grupo carboxílico, de preferência um grupo carboximetila, como substituinte carregado, e resinas de troca de ânion fraca têm um grupo dietilaminoetila como substituinte carregado.

- Resinas de troca de cátion estão disponíveis sob nomes diferentes de uma pluralidade de companhias tal como Bio-Rex, Macro-Prep CM (disponíveis da Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA), trocador de cátion fraco WCX 2 (disponível da CIPHERGEN, Fremont, CA, USA), Dowex® MAC-3

(disponível da Dow Chemical Company – separações de líquido, Midland, MI, USA), Mustang C (disponível da Pall Corporation, East Hills, NY, USA), Cellulose CM-23, CM-32, CM-52, hyper-D e partisphere (disponíveis da Whatman plc, Brentford, Reino Unido), Amberlite® IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (disponíveis da Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemanha), CM 1500, CM 3000 (disponíveis da BioChron Labs, Terre Haute, IN, USA) e CM-Sepharose® Fast Flow (disponível da GE Healthcare – Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Alemanha).

De preferência, os substituintes carregados do material de troca de íon fraco são pelo menos cerca de 90% de grupos de ácido carboxílico, mais de 90% de grupos de ácido carboxílico ou mais de 95% de grupos de ácido carboxílico.

Os termos "eluição em etapa única" e "eluição com gradiente de etapa única", que são usados intercomutavelmente no presente pedido, significam um método onde, por exemplo, a concentração de uma substância causando eluição, isto é, a dissolução de um composto ligado a partir de um material, é aumentada ou diminuída de uma vez, isto é, diretamente de um valor/nível de partida para um valor/nível final, isto é, em uma etapa única.

Um "polipeptídeo" é um polímero de resíduos de aminoácido unidos por ligações peptídeo, seja produzido naturalmente ou sinteticamente. Polipeptídeos de menos do que cerca de 20 resíduos de aminoácido são referidos como "peptídeos".

Uma "proteína" é uma macromolécula compreendendo uma ou mais cadeias de polipeptídeo ou uma cadeia de polipeptídeo de mais de 100 resíduos de aminoácido. Uma proteína pode também compreender componentes não-peptídicos, tal como grupos carboidrato. Carboidratos e outros substituintes não-peptídicos podem ser adicionados a uma proteína através da célula onde a proteína é produzida, e vão variar com o tipo de célula. Proteínas são definidas aqui em termos de suas estruturas principais de aminoácido, substituintes tal como grupos carboidrato são geralmente não especificados, mas podem estar presentes contudo.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" que podem ser usados

intercomutavelmente no presente pedido compreendem pelo menos duas cadeias de polipeptídeo leves e duas cadeias de polipeptídeo pesadas. Cada uma das cadeias de polipeptídeo pesada e leve contém uma região variável (geralmente a porção amino terminal da cadeia de polipeptídeo) que contém um domínio de ligação para interação com o antígeno. Cada uma das cadeias de polipeptídeo pesada e leve também compreende uma região constante (geralmente a porção terminal carboxila) que pode mediar a ligação do anticorpo a tecidos hospedeiros ou fatores incluindo várias células do sistema imune, algumas células fagocíticas e primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico. Tipicamente, as cadeias de polipeptídeo leve e pesada são cadeias completas, cada uma consistindo essencialmente em uma região variável, isto é, V_L ou V_H e uma região constante completa, isto é, de C_L no caso de uma cadeia de polipeptídeo leve ou de C_H1 , C_H2 , C_H3 e opcionalmente C_H4 no caso de uma cadeia de polipeptídeo pesada.

As regiões variáveis do anticorpo de acordo com a invenção podem ser enxertadas em regiões constantes de outros isotipos. Por exemplo, um polinucleotídeo codificando a região variável de uma cadeia pesada do isotipo 1 pode ser enxertado no polinucleotídeo codificando a região constante de uma outra classe de cadeia pesada (ou subclasse).

Conforme aqui usado, o termo "anticorpo" ou "imunoglobulina" refere-se a uma proteína consistindo em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de anticorpo. Os genes de anticorpo reconhecidos incluem os genes de região constante diferentes bem como os genes de região variável de anticorpo miríades. Anticorpos podem existir em uma variedade de formas, incluindo, por exemplo, Fv, Fab e F(ab)2 bem como cadeias simples (por exemplo, Huston, J.S. e outros, *PNAS USA* 85 (1988) 5879-5883; Bird e outros, *Science* 242 (1988) 423-426; e, em geral, Hood e outros, *Immunology*, Benjamin N.Y., 2ª edição (1984) e Hunkapiller e Hood, *Nature* 323 (1986) 15-16). Em uma modalidade anticorpos de acordo com a presente invenção compreendem anticorpos monoclonais e seus fragmentos, por exemplo, cadeias pesadas ou leves isoladas, ou cadeias pesadas ou leves apenas consistindo em regiões constantes bem como

seus fragmentos.

Métodos cromatográficos gerais e seu uso são conhecidos de uma pessoa versada na técnica. Vide, por exemplo, *Chromatography*, 5ª edição, Parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, Nova York, (1992); *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science, B.V., Amsterdam, Países Baixos (1998); *Chromatography Today*, Poole, C.F. e Poole, S.K., Elsevier Science Publishing Company, Nova York (1991); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Sambrook, J. e outros, (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; ou *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. e outros, (eds.), John Wiley and Sons, Inc., Nova York.

A presente invenção provê um método para purificação de uma imunoglobulina, onde o método compreende as etapas que seguem:

a) provisão de uma solução compreendendo uma imunoglobulina, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

b) trazer a solução e um material de troca de íon fraca em contato sob condições com o que a imunoglobulina se liga ao material de troca de íon fraca;

c) recuperação da imunoglobulina a partir do material de troca de íon fraca em uma etapa única através do uso de uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal.

O processo de purificação de imunoglobulinas em geral compreende uma parte cromatográfica multietapa. Na primeira etapa, polipeptídeos e proteínas não-imunoglobulina são separados da fração de imunoglobulina através de uma cromatografia de afinidade, por exemplo, com proteína A. Em seguida uma cromatografia de troca de íon pode ser realizada para separar as classes de imunoglobulina individuais e para remover traços de proteína A, que foi co-eluída da primeira coluna. Finalmente, uma terceira etapa cromatográfica é necessária para separar monômeros de imunoglobulina de multímeros e fragmentos da mesma classe. Algumas vezes a quantidade de

agregados é alta (5% ou mais) e não é possível separá-los eficientemente na terceira etapa de purificação necessitando de etapas de purificação adicionais.

5 Com a produção recombinante de imunoglobulinas específicas, a etapa de separação para a separação de classes de imunoglobulinas diferentes é dispensável. Deste modo, o processo de purificação geral de imunoglobulinas recombinantemente produzidas pode ser reduzido a duas etapas cromatográficas.

10 O eluato de proteína A condicionado é em geral cromatograficamente processado em um material de troca de cátion em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da respectiva proteína imunoglobulina.

O anticorpo anti-IL-1R (WO 2005/023872) e Herceptin[®], um anticorpo anti-HER2 (WO 99/57134), estavam disponíveis em quantidades suficientes nos laboratórios da requerente no momento da invenção e então a presente invenção é exemplificada com essas duas imunoglobulinas. Da mesma maneira a invenção é em geral praticável com imunoglobulinas. Esta descrição exemplificada é feita apenas a título de exemplo e não a título de limitação da invenção. Esses exemplos são providos para auxiliar na compreensão da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é apresentado nas reivindicações apensas.

15
20

A presente invenção descreve um método de purificação para a separação de monômeros de imunoglobulina a partir de agregados e fragmentos bem como a depleção de outras impurezas do polipeptídeo. Como pode ser visto a partir do experimento, esta purificação é obtida através do uso de resinas de troca de íon fraca, de preferência através do uso de resinas de troca de cátion fraca. Conforme exemplificado através de comparação de materiais de troca de íons forte e fraca o material de troca de íon fraca provê uma separação de formas monoméricas e agregadas das imunoglobulinas (vide exemplos 1 e 2 e exemplos 9 e 12).

25

30 Em uma modalidade da invenção, o valor do pH do material tampão (substância) é de a partir de pH 3,0 a pH 10,0, de preferência de a partir de pH 3,0 a pH 7,0, com mais preferência de a partir de pH 4,0 a pH

6,0 e com mais preferência de a partir de pH 4,5 a pH 5,5.

Em uma modalidade o valor do pH é mantido constante na etapa única, isto é, ele é mantido no mesmo valor na etapa única.

Um outro item preferido da presente invenção é que o método da presente invenção é aplicável a imunoglobulinas que têm um ponto isoe-
5 létrico (pI) de 6,0 ou mais ($pI \geq 6,0$) e então têm uma carga positiva líquida na faixa de pH partindo de pH 6,0 a pH 14.

Uma modalidade preferida da invenção é a purificação de uma imunoglobulina da classe IgG ou IgE.

10 Um material de troca de cátion fraco é usado em uma modalidade preferida da presente invenção.

Um material tampão é de preferência empregado em uma faixa de concentração entre 5 mM e 100 mM conforme exemplificado.

Para a recuperação das imunoglobulinas ligadas a partir do ma-
15 terial de troca de íon fraco a condutividade do tampão/solução é aumentada. Isto pode ser realizado ou através de uma concentração de sal de tampão maior ou através da adição de outros sais, os chamados sais de eluição, à solução tampão. Sais de eluição preferidos são citrato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de po-
20 tássio, fosfato de potássio, bem como outros sais de ácido cítrico e ácido fosfórico, e qualquer mistura desses componentes. Especialmente preferidos são citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e suas misturas.

A concentração do sal, causando a eluição, está de preferência na faixa entre 5 mM e 500 mM, com mais preferência entre 5 mM e 400 mM
25 e especialmente preferido entre 5 mM e 250 mM.

Uma outra modalidade preferida da invenção é o uso do sal, causando a eluição, ao mesmo tempo que a substância tampão, especialmente com ácido cítrico e seus sais ou ácido fosfórico e seus sais.

O método da presente invenção é de preferência um método cromatográfico ou em batelada, especialmente preferido é um método com-
30 preendendo uma eluição em batelada.

Uma outra modalidade preferida da presente invenção é que a

purificação é um processo de purificação de etapa única.

Uma "etapa única" significa um processo onde uma ou mais condições, por exemplo, o pH, a resistência iônica, concentração de um sal e/ou o fluxo de uma cromatografia, é/são mudados todos de uma vez a partir de um valor de partida para um valor final, isto é, as condições são mudadas incrementalmente, isto é, em etapas, em contraste com mudança linear.

Ainda uma modalidade preferida da presente invenção é que o método compreende a etapa adicional de purificação de imunoglobulina através de uma cromatografia de afinidade de proteína A antes da etapa a) do método.

A presente invenção provê ainda um método para determinação da concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única, compreendendo as duas etapas que seguem:

- 15 a) etapa um compreendendo as subetapas que seguem
 - a1) provisão de uma solução compreendendo um polipeptídeo, uma substância tampão e, opcionalmente, um sal;
 - a2) trazer uma primeira alíquota da solução contendo o polipeptídeo e o material de troca de íon em contato sob condições com o que o polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;
 - 20 a3) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso de uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal, com o que a concentração do sal aumentou linearmente;
 - a4) determinação da concentração de partida do sal onde a primeira fração do polipeptídeo começa a eluir a partir da coluna de troca de íon;
 - 25 b) etapa dois compreendendo as subetapas que seguem
 - b1) trazer uma segunda alíquota da solução contendo o polipeptídeo e um material de troca de íon em contato sob condições com o que o polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;
 - 30 b2) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso do método de eluição de três etapas, com o que

i) a concentração de sal da primeira etapa de eluição é calculada como a soma do produto da concentração de partida do sal conforme determinado na etapa a4) e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal

5

e

do produto da concentração do sal tampão e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal tampão;

10 iii) a concentração de sal da segunda etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,25 e 1,35;

iii) a concentração de sal da terceira etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,50 e 1,70;

15 com o que os fatores das etapas ii) e iii) são determinados como segue: em uma concentração de partida entre 10 mM e 40 mM os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em uma concentração de partida entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60, respectivamente, e em uma concentração de partida de mais de 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50, respectivamente.

20

b3) determinação em qual subetapa do método de eluição de três etapas da etapa b2) o polipeptídeo é eluído da coluna de troca de íon deste modo determinando a concentração do sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única.

25

Os fatores da etapa b2) definem uma faixa que foi determinada experimentalmente. Esses valores não são valores absolutos mas meramente um valor-alvo. Um desvio de 10% pode ser mantido.

30 A presente invenção descreve um método para determinação da concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única para a purificação de polipeptídeos a partir de outro material proteínico.

A concentração, na qual a eluição do polipeptídeo, de preferência de uma imunoglobulina, a partir da resina de troca de íon começa, provê a base para a segunda etapa de otimização b), um método de eluição de três etapas. As concentrações de tampão/sal aproximadas para a eluição em

5 etapa são calculadas como segue:

- a concentração de sal da primeira etapa de eluição é igual à soma de como primeiro somatório (*summand*) o produto da concentração do sal, na qual a eluição da coluna de troca de íon começa conforme determinado com o gradiente de sal em aumento linear, e o número total de cátions

10 monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal causando a eluição

e

como segundo somatório o produto da concentração do sal tampão e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na

15 fórmula molecular do sal tampão;

- a concentração de sal da segunda etapa de eluição é igual ao produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,25 e 1,35;

- a concentração de sal da terceira etapa de eluição é igual ao

20 produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator dentre 1,50 e 1,70.

O fator incluído no cálculo das etapas de concentração é responsável pelo intervalo entre os níveis de concentração e é ajustado dependendo da concentração de partida. Em concentrações de partida pequenas,

25 isto é, entre 10 mM e 40 mM, os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em concentrações de partida médias entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60, respectivamente e em concentrações de partida altas de mais de 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50 respectivamente. Esses fatores definem uma faixa que foi determinada experimentalmente. Esses valores não

30 são valores absolutos mas meramente um valor-alvo. Um desvio de 10% pode ser mantido.

O sal tampão tem que ser registrado no cálculo porque é possí-

vel, conforme mostrado no Exemplo 3, que a eluição de uma proteína a partir de uma resina de troca de íon possa ser afetada por uma mudança da concentração de sal tampão durante a cromatografia. Se a concentração de sal tampão for mantida constante durante a cromatografia ou for pequena comparado com a concentração declarada do sal que causa a eluição, ele pode ser negligenciado durante o cálculo para reduzir a complexidade.

Em uma modalidade o sal que causa a eluição não é o sal tampão e a concentração de sal da etapa b2i) é o produto da concentração do sal, na qual a eluição da coluna de troca de íon começa conforme determinado com o gradiente de sal crescente linear na etapa a4), e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal que causa a eluição.

O cálculo será exemplificado com base no exemplo 4 com o anticorpo IL-1R. Com uma concentração de partida de 15 mM de citrato de sódio, conforme determinado no exemplo 3, consistindo em uma concentração de tampão a 10 mM e uma contribuição de 5 mM a partir do gradiente linear, as três etapas são calculadas como segue:

- a concentração-alvo para etapa um é calculada ser 30 mM ($5 \text{ mM} \times 2 + 10 \text{ mM} \times 2$) de citrato de sódio em detalhe: 5 mM (concentração de partida) multiplicado por dois (ácido cítrico é um ácido trivalente, empregado como sal dissódico; deste modo dois cátions monovalentes diferentes de hidrogênio estão presentes na fórmula molecular) mais 10 mM (concentração de sal tampão) multiplicado por dois (ácido cítrico é um ácido trivalente, empregado como sal dissódico; deste modo dois cátions monovalentes diferentes de hidrogênio estão presentes na fórmula molecular)

- a concentração-alvo para etapa dois é calculada ser 40,5 mM ($30 \text{ mM} \times 1,35$) de citrato de sódio em detalhe: citrato de sódio a 30 mM é a concentração da etapa um multiplicada por 1,35 (a concentração de partida é 15 mM, portanto valor 1,35 é selecionado)

- a concentração-alvo para etapa três é calculada ser 51 mM ($30 \text{ mM} \times 1,70$) de citrato de sódio em detalhe: citrato de sódio a 30 mM é a concentração da etapa 1 multiplicada por 1,70 (a concentração de partida é 15

mM, portanto fator 1,70 é selecionado)

Como pode ser visto a partir dos experimentos esta purificação é conseguida em uma modalidade preferida através do uso de um material de troca de íon fraca, especialmente de preferência de um material de troca de
5 cátion fraca.

Uma modalidade preferida da invenção é que o polipeptídeo é uma imunoglobulina, especialmente de preferência uma imunoglobulina da classe IgG ou IgE.

Em uma modalidade da invenção, o valor do pH do material/substância tampão é de a partir de pH 3,0 a pH 10,0, de preferência de a
10 partir de pH 3,0 a pH 7,0, com mais preferência de a partir de pH 4,0 a pH 6,0 e com mais preferência de a partir de pH 4,5 a pH 5,5.

Um outro item preferido da presente invenção é que o método da presente invenção é aplicável a imunoglobulinas que têm um ponto isoe-
15 létrico (pI) de 6,0 ou mais ($pI \geq 6,0$) e então têm uma carga positiva líquida na faixa de pH partindo de pH 6,0 a pH 14.

O material/substância tampão é de preferência empregado em uma faixa de concentração entre 5 mM e 100 mM conforme exemplificado.

Para a recuperação das imunoglobulinas ligadas a partir do ma-
20 terial de troca de íon a condutividade do tampão/solução é aumentada. Isto pode ser realizado ou através de uma concentração de sal tampão maior ou através da adição de outros sais, os chamados sais de eluição, à solução tampão. Sais de eluição preferidos são citrato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio,
25 fosfato de potássio, bem como outros sais tal como ácido cítrico e fosfórico, e qualquer mistura desses componentes.

Especialmente preferidos são citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e qualquer mistura deles.

A concentração do sal, que causa a eluição, está de preferência
30 na faixa entre 5 mM e 500 mM, com mais preferência entre 5 mM e 400 mM e especialmente de preferência entre 5 mM e 250 mM.

Uma outra modalidade preferida da invenção é o uso do sal, que

causa eluição, ao mesmo tempo que a substância tampão, especialmente com ácido cítrico e seus sais ou ácido fosfórico e seus sais.

O método da presente invenção é de preferência um método cromatográfico ou em batelada, especialmente preferido é um método compreendendo uma eluição em batelada.

Uma outra modalidade preferida da presente invenção é que a purificação é um processo de purificação em etapa única.

Uma modalidade ainda preferida da presente invenção é que o método compreende a etapa adicional de purificação da imunoglobulina através de cromatografia por afinidade de uma proteína A antes da etapa a) do método.

Os exemplos e figuras que seguem são providos para auxiliar na compreensão da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é mostrado nas reivindicações apensas. É compreendido que modificações podem ser feitas nos procedimentos mostrados sem se afastar do espírito da invenção.

Descrição das Figuras

Figura 1 - Eluição em etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir de resina de troca de cátion forte SP-Sepharose; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor não são separadas e eluem como um pico.

Figura 2 - Eluição em etapa única de anticorpo IL-1R a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Toyopearl; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são parcialmente separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina e um segundo pico, compreendendo formas monomérica e agregada da imunoglobulina bem como proteína A.

Figura 3 - Eluição com gradiente linear de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Toyopearl com citrato de sódio em pH 5,0; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são parcialmente separadas e eluem em uma concentração de partida de citrato de sódio de 15 mM como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina e como um segundo pico, compreendendo uma mistura de forma monomérica, formas agregadas da imunoglobulina, e proteína A.

A análise SEC das duas frações é inserida no cromatograma de troca de íon. No pico principal agregados estão ausentes. Em contraste no segundo pico formas agregadas da imunoglobulina estão presentes.

Figura 4 - Eluição com gradiente de três etapas de anticorpo IL-1R a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Toyopearl com citrato de sódio em pH 5,0; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são parcialmente separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina em uma concentração de citrato de sódio de 34 mM e um segundo pico compreendendo formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina bem como proteína A em uma concentração de citrato de sódio de 44 mM.

Figura 5 - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com 150 mM de cloreto de sódio em pH 5,5; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina e como um segundo pico compreendendo formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina bem como proteína A.

Figura 6a - Perfil de eluição em CM-Sepharose fast flow; dois picos podem ser identificados: um pico principal, correspondendo ao anticorpo anti IL-1R monomérico, e um segundo pico menor, que contém principalmente agregados e outras impurezas.

Figura 6b - Perfil de eluição de anticorpo anti IL-1R em uma SP-sepharose fast flow; um pico pode ser identificado, o qual contém imunoglobulinas monoméricas, agregados e outras impurezas que não foram separadas nesta coluna.

Figura 7a - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio a 100 mM em pH 5,5.

Figura 7b - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de íon fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio a 150 mM em pH 5,5.

Figura 7c - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de íon fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio a 200 mM em pH 5,5.

Figura 8a - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio a 150 mM em pH 4,0.

Figura 8b - Eluição com gradiente de etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio a 150 mM em pH 6,0.

Etapa 9a - Eluição em etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose; cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) do material de partida mostrando ambas formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina.

Figura 9b - Eluição em etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são parcialmente separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina e como um segundo pico, compreendendo formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina bem como outra proteína. Nesta figura, a cromatografia de exclusão de tamanho do primeiro pico (principal) é mostrada. Apenas um pico é eluído a partir da coluna SEC, que é a imunoglobulina monomérica.

Figura 9c - Eluição em etapa única de anticorpo anti IL-1R a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose; formas monoméricas e agregadas do anticorpo receptor são parcialmente separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina e um segundo pico, compreendendo formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina bem como outra proteína. Nesta figura a cromatografia de exclusão de tamanho do segundo pico é mostrada. No cromatograma, pelo menos três picos podem ser vistos, equivalentes a formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina e outra proteína.

Figura 10 - Eluição em etapa única de anticorpo anti-HER-2 a partir da resina de troca de cátion forte SP-Sepharose; formas monoméricas

e agregadas do anticorpo não são separadas e eluem como um pico.

Figura 11 - Eluição com gradiente linear de anticorpo anti-HER-2 a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio em tampão de citrato de sódio em pH 5,5; formas monoméricas e agregadas do anticorpo são parcialmente separadas e eluem com uma concentração de partida de 80 mM de cloreto de sódio como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina; as formas monomérica e agregada eluem como mistura no alargamento ("*tailing*") do pico principal junto com a proteína A.

Figura 12 - Eluição com gradiente em três etapas de anticorpo anti-HER-2 a partir da resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com cloreto de sódio em tampão de citrato de sódio em pH 5,5; formas monoméricas e agregadas do anticorpo são separadas e eluem como um pico principal compreendendo a forma monomérica da imunoglobulina em uma concentração de cloreto de sódio de 80 mM e como um segundo pico compreendendo formas monoméricas e agregadas da imunoglobulina bem como proteína A em uma concentração de cloreto de sódio de 100 mM.

Figura 13 - Eluição com gradiente em etapa única de anticorpo anti-HER-2 a partir de resina de troca de cátion fraca CM-Sepharose com 80 mM de cloreto de sódio em pH 5,5; a forma monomérica é eluída livre de formas agregadas; as formas agregadas eluem após uma segunda etapa de cloreto de sódio para 120 mM como um segundo pico definido.

Figura 14 - Eluição com gradiente em etapa única de anticorpo anti-HER-2 a partir de resina de troca de cátion forte SP-Sepharose com 80 mM de cloreto de sódio em pH 5,5; dois picos são obtidos: o pico 1 contém apenas Herceptina® monomérica, pico 2, que é eluído após uma segunda etapa de cloreto de sódio para 120 mM, contém uma quantidade grande de Herceptina® monomérica e agregados; o rendimento de Herceptina® nesta forma monomérica é menos do que 60%.

Parte Experimental

Material:

Um anticorpo anti IL-1R de imunoglobulina IgG4 (daqui em dian-

te referido como imunoglobulina, WO 2005/023872) foi purificado em uma primeira etapa com uma cromatografia por afinidade de proteína A. Eluição a partir da coluna da proteína A foi realizada sob condições ácidas (tampão de citrato de sódio a 10 mM, valor de pH de $3,0 \pm 0,5$). Antes da etapa de filtra-
 5 gem o valor do pH da fração contendo a imunoglobulina foi ajustado com uma solução tampão concentrada, por exemplo, 1M, de pH 9,0 (por exemplo, tris-hidroximetil-amino metano (TRIS) ou tampão de fosfato) para pH 5,0. O eluato da proteína A é uma solução com uma concentração de proteína entre 5 mg/ml e 15 mg/m e é tamponado com citrato de sódio. Este mate-
 10 rial é referido a seguir como eluato de proteína A condicionado, que é preparado para carregamento em uma resina de troca catiônica.

Exemplo 1

Neste exemplo comparativo uma cromatografia de troca de íon com uma resina de troca de cátion forte e uma eluição em etapa única é
 15 descrita.

Condições cromatográficas:

Resina:	SP-Sepharose
Taxa de fluxo:	160 cm/h
Equilíbrio:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 20 5,0
Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
Etapa de lavagem:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
Eluição:	tampão de citrato de sódio a 25 mM com cloreto de sódio 25 a 100 mM, ajustado para pH 5,0

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion forte (SP-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imu-
 30 noglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição em etapa única, com o queo valor do pH foi mantido constante e a condutividade foi variada (aumentada) através da adição de cloreto de sódio.

Na Figura 1 o cromatograma de eluição da cromatografia de troca de cátion do anticorpo anti IL-1R na resina de troca de cátion forte SP-Sepharose é apresentado. A eluição é uma eluição de substituição de etapa única com cloreto de sódio sem alteração do valor do pH do sistema cromatográfico. As moléculas de imunoglobulina monoméricas e agregadas não são separadas e então com este método nenhuma purificação através de redução do teor de agregado no eluato comparado com o material de carga pode ser obtida.

Exemplo 2

Neste exemplo uma cromatografia de troca de íon com uma resina de troca de cátion fraca e eluição em etapa única é descrita.

Para se obter uma separação de formas monoméricas e agregadas de uma imunoglobulina, uma resina de troca de cátion fraca foi empregada. Usando este tipo de resina um aumento da condutividade através de uma eluição em etapa é acompanhado por uma mudança de pH particular na resina (mesmo quando o pH do tampão de eluição permanece constante). Este efeito facilita a discriminação, por exemplo, entre imunoglobulinas monoméricas e formas agregadas. Ainda, outras impurezas, tal como traços de proteínas de célula hospedeiro ou proteína A, podem eficientemente ser separadas da fração média monomérica, sem perda significativa no rendimento.

Condições cromatográficas:

Resina:	CM-Toyopearl
Taxa de fluxo:	160 cm/h
Equilíbrio:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
Lavagem:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
Eluição:	tampão de citrato de sódio a 25 mM com cloreto de sódio a 100 mM, ajustado para pH 5,0

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado à coluna de

cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Toyopearl). Após a etapa de carregamento em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição em etapa única, com
5 o que o valor do pH na fase móvel foi mantido constante e a condutividade foi variada através da adição de cloreto de sódio.

Na figura 2 o perfil de eluição com as mesmas condições cromatográficas como no exemplo 1 mas desta vez com uma resina de troca de cátion fraca, CM-Toyopearl, é apresentado. Aqui um segundo pico como um
10 ressalto do pico principal aparece. Este comportamento de separação é diferente daquele com resina de troca de cátion forte, tal como SP-Sepharose. Uma análise de frações correspondendo ao pico principal e ao segundo pico de ressalto mostrou uma quantidade significativa de agregados estar presente na fração de pico de ressalto. Quaisquer agregados eram detectáveis nas
15 frações de pico principal (vide figuras 9a a c).

Exemplo 3

Otimização do método cromatográfico - primeira etapa: gradiente de concentração linear.

Para otimizar a cromatografia de troca de cátion em um material
20 de troca de cátion fraca um procedimento de otimização, que consiste em três etapas, foi posto em prática:

a primeira etapa é uma cromatografia usando um gradiente de concentração linear do sal tampão, citrato de sódio. Melhor assim é possível manter a concentração do sal tampão constante e misturar uma concentra-
25 ção linearmente crescente de um sal causando a eluição da imunoglobulina. Em ambos casos a condutividade da solução aumentou sem uma alteração do valor do pH da fase móvel. Sais adequados para eluição são, por exemplo, cloreto de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio, fosfato de potássio, ácido cítrico e seus sais bem como
30 misturas desses componentes. As concentrações de a partir de 10 mM a 500 mM, que são aplicadas, são ajustadas conseqüentemente para ajustar a condutividade na faixa de a partir de cerca de 1 mili S/cm a cerca de 50 mili

S/cm.

Condições cromatográficas:

	Resina:	CM-Toyopearl
	Taxa de fluxo:	160 cm/h
5	Equilíbrio:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
	Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
	Lavagem:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
10	Eluição:	gradiente linear; de a partir de tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0, a tampão de citrato de sódio a 100 mM, ajustado para pH 5,0

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Toyopearl). Após uma etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a
 15 coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente linear, com o queo valor de pH na fase móvel foi mantido constante. A concentração do sal tampão, citrato de sódio, foi aumentada linearmente de
 20 10 mM para 100 mM em 40 volumes de coluna. Após a concentração de citrato de sódio final ter sido atingida a eluição foi continuada por mais 40 volumes de coluna.

Na figura 3 o cromatograma da eluição com gradiente linear do anticorpo anti IL-1R é apresentado. As formas monomérica e agregada da
 25 imunoglobulina eluem em um pico semi-separado em uma concentração de citrato de sódio a 15 mM e terminando em uma concentração de citrato de sódio a 55 mM.

A recuperação da imunoglobulina ligada a partir da resina de troca de cátion é dependente da condutividade da solução aplicada. Deste
 30 modo os cátions do sal tampão presentes na solução de eluição durante a etapa de recuperação devem ser considerados como efetuando a eluição da imunoglobulina a partir da resina de troca de cátion. A condutividade bem

como a resistência iônica da fase móvel são efetuadas pelo número total de íons na solução. Deste modo o número de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio em uma fórmula molecular do sal tampão empregado e do sal tampão empregado causando a eluição têm que ser considerado então.

5 Exemplo 4

Otimização do método cromatográfico – segunda etapa: eluição com gradiente de concentração de três etapas.

A concentração, na qual a eluição da imunoglobulina a partir da resina de troca de íon começa, conforme determinado no exemplo 3, provê a base para a segunda etapa de otimização, um método de eluição de três etapas. As concentrações de tampão/sal aproximadas para a eluição em etapas são calculadas como segue:

- a concentração de sal da primeira etapa de eluição é igual à soma de

como primeira somatório o produto da concentração do sal, na qual a eluição a partir da coluna de troca de íon começa conforme determinado com o gradiente de sal em aumento linear, e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal que causa eluição

20 e

como segundo somatório o produto da concentração do sal tampão e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal tampão;

- a concentração de sal da segunda etapa de eluição é igual ao produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,25 e 1,35;

- a concentração de sal da terceira etapa de eluição é igual ao produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,50 e 1,70.

30 O fator incluído no cálculo das etapas de concentração é responsável pelo intervalo entre os níveis de concentração e é ajustado dependendo da concentração de partida. Em concentrações de partida pequenas,

isto é, entre 10 mM e 40 mM, os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em concentrações de partida média entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60, respectivamente, e em altas concentrações de partida de mais do que 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50 respectivamente.

- 5 Os fatores definem uma faixa que foi determinada experimentalmente. Esses valores não são valores absolutos mas meramente um valor-alvo. Um desvio de 10% pode ser mantido.

O sal tampão tem que ser registrado no cálculo porque é possível conforme mostrado no exemplo 3 que a eluição de uma proteína de uma
10 resina de troca de íon pode ser efetuada por uma mudança na concentração de sal tampão durante a cromatografia. Se a concentração de sal tampão for mantida constante durante a cromatografia ou for pequena comparada com a concentração de partida ($\leq 15\%$ da concentração de sal) ele pode ser negligenciado durante o cálculo para reduzir a complexidade.

- 15 Com uma concentração de partida de 15 mM de citrato de sódio, conforme determinado no exemplo 3, consistindo em uma concentração de tampão de 10 mM e uma contribuição de 5 mM a partir do gradiente linear, as três etapas podem calculadas como segue:

- a concentração-alvo para a etapa 1 é calculada ser 30 mM (5
20 $\text{mM} \times 2 + 10 \text{ mM} \times 2$) de citrato de sódio em detalhe: 5 mM (concentração de partida) multiplicado por dois (ácido cítrico é um ácido trivalente, empregado como sal de dissódio; deste modo dois cátions monovalentes diferentes de hidrogênio estão presentes na fórmula molecular) mais 10 mM (concentração do sal tampão) multiplicados por dois (ácido cítrico é um ácido trivalente,
25 empregado como sal de dissódio; deste modo dois cátions monovalentes diferentes de hidrogênio estão presentes na fórmula molecular)

- a concentração-alvo para a etapa 2 é calculada ser 40,5 mM (30 mM $\times 1,35$) de citrato de sódio em detalhe: 30 mM de citrato de sódio é a concentração da etapa 1 multiplicada por 1,35 (a concentração de partida é
30 15 mM, portanto como fator 1,35 é selecionado)

- a concentração-alvo para a etapa 3 é calculada ser 51 mM (30 mM $\times 1,70$) de citrato de sódio em detalhe: 30 mM de citrato de sódio é a

concentração da etapa 1 multiplicados por 1,70 (a concentração de partida é 15 mM, portanto como fator 1,70 é selecionado)

Condições cromatográficas:

	Resina:	CM-Toyopearl
5	Taxa de fluxo:	160 cm/h
	Equilíbrio:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
	Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
10	Lavagem:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
	Eluição:	etapa 1: tampão de citrato de sódio a 34 mM, ajustado para pH 5,0
		etapa 2: tampão de citrato de sódio a 44 mM, ajustado para pH 5,0
15		etapa 3: tampão de citrato de sódio a 54 mM, ajustado para pH 5,0

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Toyopearl). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 150 cm/h a co-

20 luma foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente de etapa única (= um método onde a concentração do sal de eluição é mudada em etapas a partir de um valor/nível de partida para um valor/nível final), com o que o valor do pH na fase móvel foi mantido constante. A con-

25 centração do sal tampão, citrato de sódio, foi aumentada de 10 mM como condição de partida para 34 mM na primeira etapa, para 44 mM na segunda etapa e para 54 mM na etapa final. Após cada aumento da concentração de sal dez volumes de coluna do tampão de eluição foram passados pela colu-

na antes da próxima etapa. Após uma concentração de citrato de sódio final

30 ter sido atingida a eluição foi continuada por mais 10 volumes de coluna.

Na figura 4 o perfil de eluição da eluição com gradiente em três etapas de anticorpo anti IL-1R está presente. A imunoglobulina monomérica

elui na fração da primeira etapa e os agregados eluem na fração da segunda etapa.

Exemplo 5

Otimização do método cromatográfico – terceira etapa: eluição de etapa única com cloreto de sódio.

A etapa final do procedimento de otimização é a adaptação a um método de eluição de etapa única (= um método onde a concentração do sal de eluição é mudada de uma vez a partir do valor de partida para um valor final). Para este propósito o pH da cromatografia é aumentado para 5,0 a 5,5. Esta mudança de pH melhora a separação da proteína A, pelo fato de que a proteína A tem um ponto isoelétrico abaixo de 5,5. Adicionalmente o sal de eluição é mudado de citrato de sódio, que é usado mais como um sal tampão, para cloreto de sódio. Análises adicionais foram realizadas (DNA, proteína de célula hospedeiro, teor de proteína A e padrão de glicosilação com LC-MS) com as frações após esta rodada cromatográfica.

Condições cromatográficas:

Resina:	CM-Sepharose
Taxa de fluxo:	160 cm/h
Equilíbrio:	citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
Lavagem:	citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,0
Eluição:	citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 150 mM, ajustado para pH 5,5

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente de etapa única (= um método onde a concentração do sal de eluição é mudada de uma vez partir de um valor de partida para um valor final), com o que o valor do pH na fase móvel foi mantido constante. A concentração do sal tampão, citrato de sódio, foi mantida constante e 150 mM de cloreto de

sódio foram misturados. Após o aumento da concentração de sal quinze volumes de coluna todo tampão de eluição foram passados pela coluna para eluir a imunoglobulina ligada.

- 5 O cromatograma de eluição da eluição de etapa única com cloreto de sódio é apresentado na figura 5. A cromatografia de gradiente de etapa única efetua a separação da fração monomérica principal e da fração de agregado/proteína A. O rendimento da imunoglobulina monomérica é mais de 80%. Rendimento de ainda mais de 95% é possível.

Exemplo 6

- 10 Comparação entre a separação com uma resina de troca de cá-
tion forte (SP-Sepharose fast flow) e uma resina de troca de cátion fraca
(CM-Sepharose fast flow).

- 15 Uma comparação entre o trocador SP-Sepharose ff forte e CM-
Sepharose ff foi feita. Experimentos foram realizados de acordo com o e-
xemplo 5 em duplicatas (apenas um de cada coluna é mostrada nas figuras
6a e 6b) e análises adicionais foram realizadas (DNA, proteína de célula
hospedeiro, teor de proteína A e padrão de glicosilação com LC-MS).

Métodos Analíticos:

Cromatografia de Exclusão

- | | | | |
|----|---------------------------|---|---------------------|
| 20 | de Tamanho: | resina: | TSK 3000 (Tosohaas) |
| | | coluna: | 300 x 7,8 mm |
| | | taxa de fluxo: | 0,5 ml/min |
| | tampão: | fosfato de potássio a 200 mM contendo clo-
reto de potássio a 250 mM, ajustado para pH | |
| 25 | | 7,0 | |
| | Sistema de limiar de DNA: | vide, por exemplo, Merrick, H., e Hawlits-
check, G., <i>Biotech Forum Europe</i> 9 (1992) | |

398-403

- 30 ELISA de DNA: As cavidades de uma placa de microtitulação são revestidas
com uma proteína policlonal A-IgG derivada de galinha. Após ligação anti-
corpo não-reagido é removido através de lavagem com tampão de amostra.
Para ligação de proteína A um volume de amostra definido é adicionado às

cavidades. A proteína A presente na amostra é ligada ao anticorpo de galinha e retida nas cavidades da placa. Após a incubação a solução de amostra é removida e as cavidades são lavadas. Para detecção são adicionados subsequentemente conjugado de anti-proteína A-IgG biotina policlonal derivado de galinha e um conjugado de peroxidase estreptavidina. Após uma etapa de lavagem adicional solução de substrato é adicionada resultando na formação de um produto de reação colorido. A intensidade da cor é proporcional ao teor de proteína A da amostra. Após um tempo definido a reação é parada e a absorbância é medida.

10 ELISA de proteína de célula hospedeiro (HCP):

As paredes das cavidades de uma placa de microtitulação são revestidas com uma mistura de albumina de soro e estreptavidina. Um anticorpo policlonal derivado de cabra contra HCP é ligado às paredes das cavidades da placa de microtitulação. Após uma etapa de lavagem cavidades diferentes da placa de microtitulação são incubadas com uma sequência de calibragem HCP de concentrações diferentes e solução de amostra. Após a incubação material de amostra não-ligado é removido através de lavagem com solução tampão. Para a detecção as cavidades são incubadas com um conjugado de anticorpo peroxidase para detectar proteína de célula hospedeiro ligada. A atividade de peroxidase fixada é detectada através de incubação com ABTS e detecção a 405 nm.

Condições cromatográficas:

	Resina:	CM-Sepharose; SP-Sepharose
	Taxa de fluxo:	160 cm/h
25	Equilíbrio:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5
	Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
	Lavagem:	tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5
30	Eluição:	tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 150 mM, ajustado para pH 5,5

Nas figuras 6a e 6b uma comparação entre o cromatograma de

eluição de uma resina de troca de cátion fraca e uma forte está presente. Usando uma resina de troca de cátion fraca (figura 6a) uma separação do anticorpo anti IL-1R monomérico de outras impurezas é obtida. Com a resina de troca de cátion forte (figura 6) nenhuma separação é possível sob as
5 mesmas condições. As frações correspondendo aos picos foram coletadas e analisadas. Os resultados de análise, que são listados na tabela 1, mostram que com resinas de troca de cátion fraca agregados e outras impurezas podem ser eficazmente depletados da preparação de imunoglobulina.

Os dados apresentados na tabela 1 mostram que é possível se-
10 parar com uma resina de troca de cátion fraca anticorpo anti IL-1R monomérico de formas agregadas do anticorpo. Ainda impurezas de DNA e proteína A podem ser depletadas.

Tabela 1: Análise dos eluatos: comparação entre SP-Sepharose e CM-Sepharose, resultados de duas separações diferentes são apresentados

Analito	Eluato de proteína A condiciona- do	Eluato de SP-Sepharose		Eluato de CM-Sepharose		
		Pico simples		Pico 1		Pico 2
Quantidade de proteína A	Entre 20 e 50 ng/mg	31 ng/mg	26 ng/mg	7,5 ng/mg	11 ng/mg	550 ng/mg
HCP	Entre 20 e 120 ng/mg	3,88 ng/mg	3,98 ng/mg	3,13 ng/mg	3,27 ng/mg	1424 ng/mg
DNA	Entre 2800 e 3500 pg/mg	36 ng/mg	16 ng/mg	157 ng/mg	131 ng/mg	1222 ng/mg
agregados	presente	presente	presente	não-presente	não-presente	presente em grande quantidade
análise de massa	quaisquer diferenças foram encontradas entre SP- e SM-Sepharose					

Exemplo 7

Exemplo comparativo - eluição em condutividades diferentes

Condições de cromatografia:

- | | | |
|----|----------------|--|
| | Resina: | CM-Sepharose |
| 5 | Taxa de fluxo: | 160 cm/h |
| | Equilíbrio: | tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5 |
| | Carga: | máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel |
| 10 | Lavagem: | tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5 |
| | Eluição: | tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 100 mM, 150 mM ou 200 mM, ajustado para pH 5,5 |

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente em etapa única, com o queo valor do pH na fase móvel foi mantido constante. A concentração do sal tampão, citrato de sódio, foi mantida constante e em três rodadas diferentes cloreto de sódio a 100 mM, 150 mM e 200 mM respectivamente foi misturado. Após o aumento da concentração de sal quinze volumes de coluna do tampão de eluição foram passados através da coluna para eluir a imunoglobulina ligada. Os cromatogramas de eluição são mostrados nas figuras 7a a c.

Boas separações foram obtidas usando cloreto de sódio a 150 mM e cloreto de sódio a 200 mM como concentração de sal de eluição.

Exemplo 8

Exemplo comparativo – eluição em valores de pH diferentes.

Condições cromatográficas:

- | | | |
|----|----------------|--|
| 30 | Resina: | CM-Sepharose |
| | Taxa de fluxo: | 160 cm/h |
| | Equilíbrio: | tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH |

- 5,5
- Carga: máx. 20 g de proteína/L de matriz emgel
- Lavagem: tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5
- 5 Eluição: tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 150 mM, ajustado para pH 4,0 ou 6,0

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h, a

10 coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente em etapa única, com o queo valor do pH na fase móvel foi mantido constante em um pH 4,0 ou 6,0, respectivamente. A concentração do sal tampão, citrato de sódio, foi mantida constante e cloreto de sódio a 150 mM foi mistu-

15 rado. Após o aumento da concentração de sal quinze volumes de coluna do tampão de eluição foram passados através da coluna para eluir a imunoglobulina ligada. Os cromatogramas de eluição são mostrados nas figuras 8a e b.

Em pH 4,0 é a tendência em formar agregados desta imunoglobulina aumentada. Mas a CM-Sepharose é capaz de separar esta quantidade de mais alta de agregados em dois picos.

20

Exemplo 9

Separação cromatográfica de um anticorpo anti-HER2 monoclonal (WO 99/57134) com uma resina de troca de cátion forte (SP-Sepharose)

25 A presente invenção é exemplificada mais a seguir com Herceptin[®], um anticorpo anti-HER-2 monoclonal.

A purificação de Herceptin[®] com uma cromatografia de troca de cátion em SP-Sepharose, uma resina de troca de cátion forte, foi realizada. Sob condições padrão da presente invenção, isto é, eluição em etapa com,

30 por exemplo, cloreto de sódio, uma separação de formas monoméricas e agregadas do anticorpo não é efetuada (figura 10).

Condições cromatográficas:

Resina:	SP-Sepharose
Taxa de fluxo:	160 cm/h
Equilíbrio:	ácido 2-morfolinoetanossulfônio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM, ajustado para pH 5,6
5 Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
Lavagem:	ácido 2-morfolinoetanossulfônio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM, ajustado para pH 5,6
Eluição:	ácido 2-morfolinoetanossulfônio a 25 mM, cloreto de sódio a 95 mM, ajustado para pH 5,6

10 O anticorpo monoclonal anti-HER-2 (daqui em diante referido como Herceptin®) foi purificado em uma primeira etapa com uma cromatografia de afinidade de proteína A. Eluição da coluna de proteína A é realizada sob condições ácidas (tampão de citrato de sódio a 10 mM, valor de pH $3,0 \pm 0,5$). Antes da etapa de filtragem o valor do pH da fração contendo o

15 anticorpo é ajustado com um tampão de tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) concentrado para pH 5,6. O eluato de proteína A é uma solução com uma concentração de proteína entre 5 mg/ml e 15 mg/ml e é tamponado com citrato de sódio.

O eluato de proteína A condicionado foi aplicado a uma coluna

20 de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion forte (SP-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição em etapa única, com o que o valor do pH foi mantido constante e a condutividade foi variada pelo aumento (em etapas) da concentração de cloreto de sódio. O cromatograma de eluição é mostrado na figura 10.

25

Nenhuma separação de formas monomérica e agregada do anticorpo foi conseguida.

Exemplo 10

30 Otimização do método cromatográfico – primeira etapa: gradiente de concentração linear.

Para melhorar a separação das duas frações as condições de

separação foram otimizadas de acordo com o procedimento conforme mostrado com o anticorpo anti IL-1R.

Em contraste com o processo de otimização de anticorpo anti IL-1R um gradiente linear de um sal (eluição), isto é, de cloreto de sódio, foi usado ao invés de um gradiente da substância tampão. O cromatograma de eluição com gradiente de cloreto de sódio linear, que corresponde à primeira etapa do procedimento de otimização, é apresentado na figura 11. Análise confirmou que o alargamento do pico principal é enriquecido com formas agregadas do anticorpo.

10 Condições cromatográficas:

Resina: CM-Sepharose

Taxa de fluxo: 160 cm/h

Equilíbrio: tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5

15 Carga: máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel

Lavagem: tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5

Eluição: gradiente linear; de tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5, a tampão de citrato de sódio a 10 mM contendo cloreto de sódio a 400 mM, ajustado para pH 5,5

O eluato de proteína A condicionado conforme descrito no exemplo 9 foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente linear, com o que o valor do pH na fase móvel e a concentração do sal tampão foram mantidos constantes. A concentração do sal de eluição, cloreto de sódio, foi aumentada linearmente de a partir de 0 mM a 400 mM em 40 volumes de coluna. O cromatograma de eluição é mostrado na figura 11.

A substituição da resina de troca de cátion forte por uma resina

de troca de cátion fraca causou a separação de um segundo pico como um ressalto do primeiro pico principal. Esta observação é similar à observação no caso de anticorpo IL-1R.

- 5 A imunoglobulina começa a eluir a partir da coluna em uma concentração de cloreto de sódio de 80 mM.

Exemplo 11

Otimização do método cromatográfico – uma segunda etapa: eluição com gradiente de concentração de três etapas.

- 10 A concentração de partida, na qual a imunoglobulina começa a eluir, conforme determinado no exemplo 10 e conforme derivado do cromatograma apresentado na figura 11, é cloreto de sódio a 80 mM. Para o cálculo das três etapas de concentração para a segunda etapa de otimização a concentração de tampão pode ser negligenciada uma vez que ela é baixa e mantida constante durante a cromatografia.

- 15 A concentração de partida do cloreto de sódio é 80 mM e cloreto de sódio tem um cátion diferente de hidrogênio em sua fórmula molecular. Deste modo as concentrações para a eluição de três etapas são calculadas ser 80 mM, 100 mM (= 80 mM multiplicados com 1,25) e 120 mM (=80 mM multiplicados por 1,50) de cloreto de sódio respectivamente.

- 20 Condições cromatográficas:

Resina: CM-Sepharose

Taxa de fluxo: 60 cm/h

Equilíbrio: tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5

- 25 Carga: máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel

Lavagem: tampão de citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH

- Eluição:
- 30 etapa 1: tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 80 mM, ajustado para pH 5,5
- etapa 2: tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 100 mM, ajustado para pH 5,5
- etapa 3: tampão de citrato de sódio a 10 mM com cloreto

de sódio a 120 mM, ajustado para pH 5,5

O eluato da proteína A condicionado conforme descrito no exemplo 9 foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição de gradiente, com o que o valor do pH na fase móvel e a concentração do sal tampão, citrato de sódio, foram mantidos constantes. A concentração do sal de eluição, cloreto de sódio, foi aumentada de 0 mM como condição de partida para 80 mM na primeira etapa, para 100 mM na segunda etapa e para 120 mM na etapa final. Após cada aumento da concentração de sal dez volumes de coluna do tampão de eluição com as concentrações de cloreto de sódio especificadas foram passados pela coluna antes da próxima etapa de concentração. Após a concentração de citrato de sódio final ter sido atingida a eluição foi continuada por mais 10 volumes de coluna. O cromatograma de eluição é mostrado na figura 12.

No método de eluição de três etapas o anticorpo monomérico é eluído na etapa com uma concentração de cloreto de sódio de 80 mM. Análise de exclusão de tamanho confirmou que apenas anticorpo monomérico é eluído. Após a concentração de cloreto de sódio ter sido aumentada para 100 mM na segunda etapa, as formas agregadas eluíram (figura 12).

Exemplo 12

Otimização do método cromatográfico – terceira etapa: eluição de etapa única com cloreto de sódio.

25 Condições cromatográficas:

Resina:	CM-Sepharose; SP-Sepharose
Taxa de fluxo:	160 cm/h
Equilíbrio:	citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5
Carga:	máx. 20 g de proteína/L de matriz em gel
30 Lavagem:	citrato de sódio a 10 mM, ajustado para pH 5,5
Eluição:	citrato de sódio a 10 mM com cloreto de sódio a 80 mM, ajustado para pH 5,5

O eluato de proteína A condicionado conforme descrito no exemplo 9 foi aplicado a uma coluna de cromatografia contendo uma resina de troca de cátion fraca (CM-Sepharose). Após a etapa de carga em uma taxa de fluxo de 160 cm/h, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (10 volumes de coluna). As imunoglobulinas ligadas foram eluídas com um método de eluição com gradiente de etapa única, com o que o valor do pH na fase móvel e a concentração de sal tampão foram mantidos constantes. A concentração do sal tampão, citrato de sódio, foi mantida constante e cloreto de sódio a 80 mM foi misturado. Após o aumento da concentração de sal quinze volumes de coluna do tampão de eluição com cloreto de sódio foram passados pela coluna para eluir o anticorpo anti-HER-2 ligado em forma monomérica. Para afirmar a separação de formas monoméricas e agregadas do anticorpo uma segunda etapa, que não é necessária para a preparação de anticorpos monoméricos, para uma concentração de cloreto de sódio de 120 mM foi realizada. Após este segundo aumento as formas agregadas do anticorpo eluíram da coluna. O cromatograma de eluição é mostrado na figura 13.

Se o mesmo método for realizado com uma resina de troca de cátion forte, uma perda significativa de anticorpo monomérico é observada (rendimento de aproximadamente 60% apenas comparado com 95% e mais em uma coluna de troca de cátion fraca), embora a separação de forma monomérica e agregada do anticorpo possa ser vista (figura 14).

Aplicação das condições adequadas para a separação em um material de troca de cátion fraca para uma resina de troca de cátion forte, SP-Sepharose, não é benéfica. Embora as duas frações possam ser separadas o rendimento do anticorpo monomérico é reduzido para 60% ou até menos.

Tabela 2: Análise dos eluatos: comparação entre SP-Sepharose e CM-Sepharose, resultados de duas separações diferentes são apresentados

Analito	Eluato de proteína A condicionado	SP-Sepharose		CM-Sepharose			
		Pico 1	Pico 1	Pico 1		Pico 2	
Quantidade de proteína A	17 ng/mg	< 3,9 ng/mg	5,7 ng/ml	<3,9 ng/ml	< 3,9 ng/ml	32,2 ng/ml	39,7 ng/ml
HCP	3243 ng/mg	49,0 ng/ml	183,4 ng/ml	107,5 ng/ml	126,2 ng/ml	1247 ng/ml	988 ng/ml
DNA	1615 pg/mg	830 pg/mg	2635 pg/mg	319 pg/mg	682 pg/mg	10554 pg/mg	<9300 pg/mg
Agregados (SEC)	0,97%	0%	32%	0%	0%	15,2%	23,0%

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificação de uma imunoglobulina, onde o método compreende:

5 a) provisão de uma solução compreendendo uma imunoglobulina, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

b) trazer a solução e um material de troca de íon fraco em contato sob condições com o que a imunoglobulina se liga a um material de troca de íon fraco;

10 c) recuperação da imunoglobulina a partir do material de troca de íon fraco em uma etapa única usando uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material de troca de íon fraco é um material de troca de cátion fraco.

15 3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que a substância tampão é ácido cítrico ou um seu sal ou ácido fosfórico ou um sal do mesmo.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o método é um método cromatográfico ou em batelada.

25 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o sal na etapa c) é selecionado do grupo consistindo em cloreto de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio, sais de ácido cítrico, sais de ácido fosfórico e misturas desses componentes.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a imunoglobulina é um membro da classe de imunoglobulina G ou E.

30 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a solução na etapa de recuperação c) tem um valor de pH de a partir de pH 3,0 a pH 7,0.

8. Método para determinação da concentração de um sal para

eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única compreendendo as duas etapas que seguem:

a) etapa um compreendendo as subetapas que seguem:
5 a1) provisão de uma solução compreendendo um polipeptídeo, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

a2) trazer uma primeira alíquota da solução contendo o polipeptídeo e um material de troca de íon em contato sob condições com o que o polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;

10 a3) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso de uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal, com o que a concentração do sal é aumentada linearmente;

a4) determinação da concentração de partida do sal onde a primeira fração do polipeptídeo começa a eluir a partir da coluna de troca de íon;
15

b) etapa dois compreendendo as subetapas que seguem

b1) trazer uma segunda alíquota da solução contendo o polipeptídeo e um material de troca de íon em contato sob condições com o que o polipeptídeo se liga ao material de troca de íon;

20 b2) recuperação do polipeptídeo a partir do material de troca de íon através do uso de um método de eluição de três etapas, com o que

i) a concentração de sal da primeira etapa de eluição é calculada como a soma de

o produto da concentração de partida do sal conforme determinado na etapa a4) e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal
25

e

o produto da concentração do sal tampão e o número total de cátions monovalentes diferentes de hidrogênio denotado na fórmula molecular do sal tampão;
30

ii) a concentração de sal da segunda etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,25

e 1,35;

iii) a concentração de sal da terceira etapa de eluição é o produto da concentração de sal da primeira etapa de eluição e um fator entre 1,50 e 1,70;

5 com o que os fatores das etapas ii) e iii) são determinados como segue: em uma concentração de partida entre 10 mM e 40 mM os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em uma concentração de partida entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60 respectivamente, e em uma concentração de partida de mais de 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50 respectivamente;

10 b3) determinação em qual subetapa do método de eluição de três etapas da etapa b2) o polipeptídeo é eluído da coluna de troca de íon deste modo determinando a concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única.

15 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca de íon é um material de cromatografia de troca de íon fraco.

20 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é uma imunoglobulina.

Fig. 1

- 040804 24 ml SP Seph ff 25 mM Citrat pH 55:1_UV1_280nm
- 040804 24 ml SP Seph ff 25 mM Citrat pH 55:1_Conc
- 040804 24 ml SP Seph ff 25 mM Citrat pH 55:1_pH
- 040804 24 ml SP Seph ff 25 mM Citrat pH 55:1_Frações
- 040804 24 ml SP Seph ff 25 mM Citrat pH 55:1_Logbook

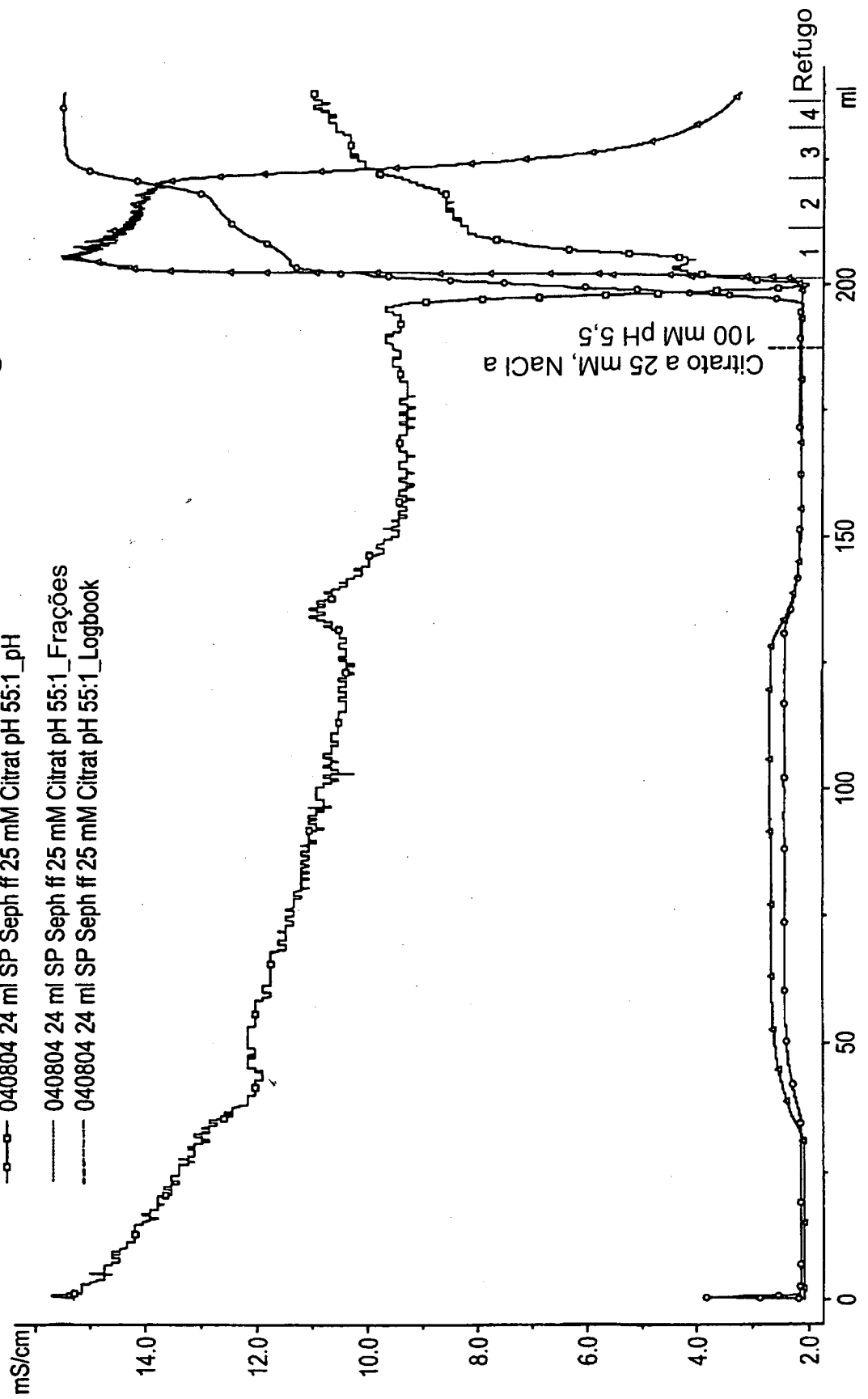
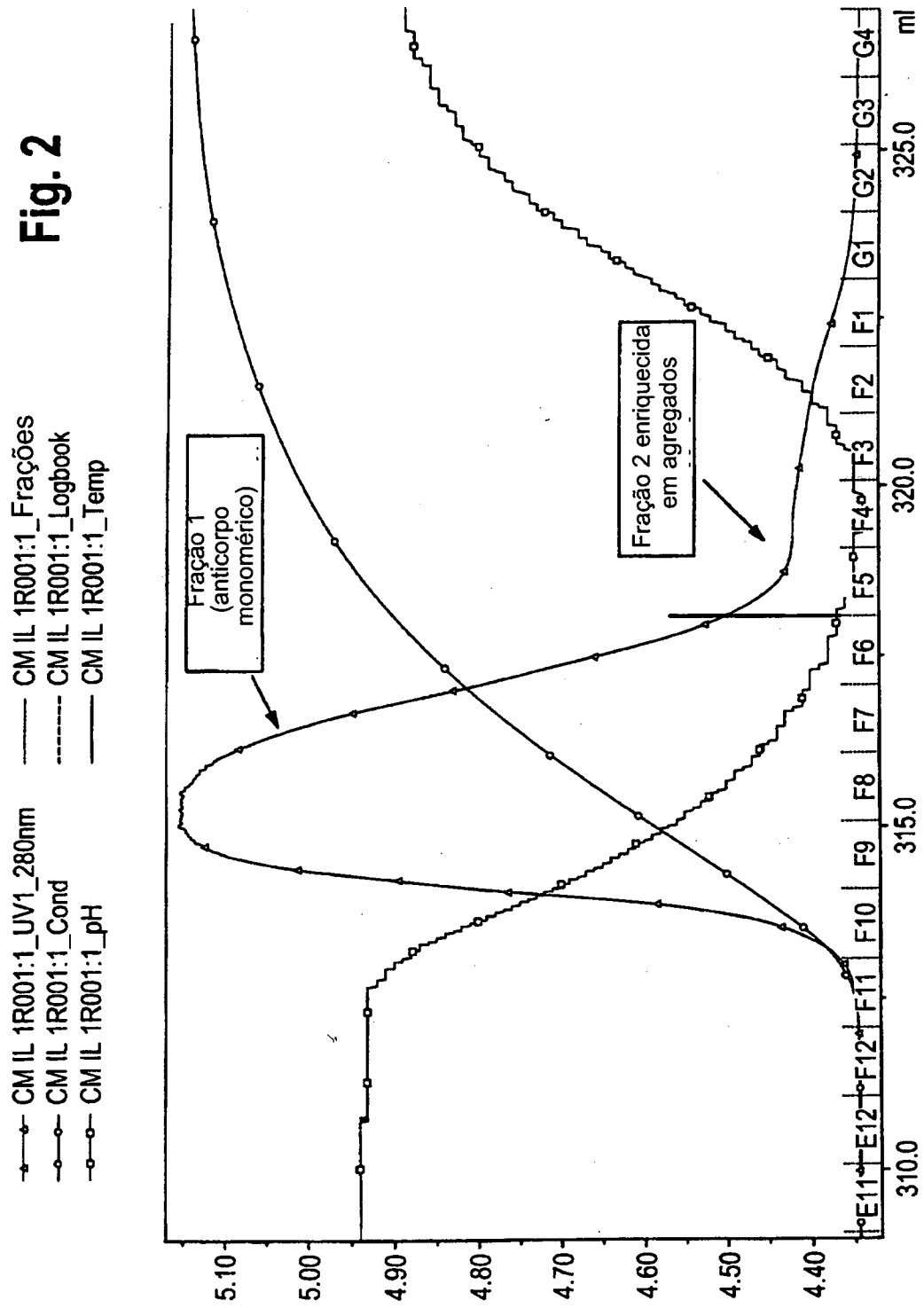


Fig. 2



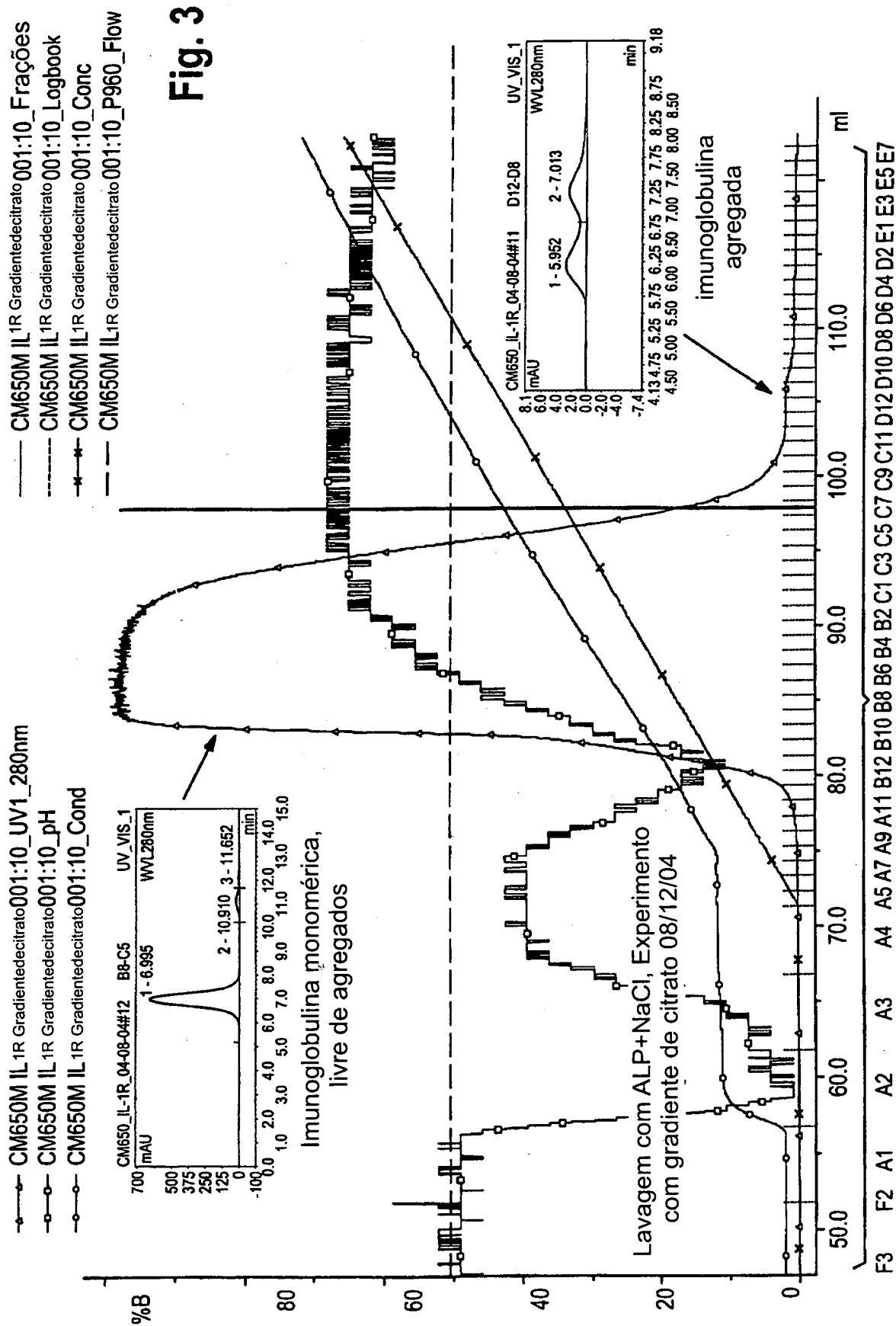
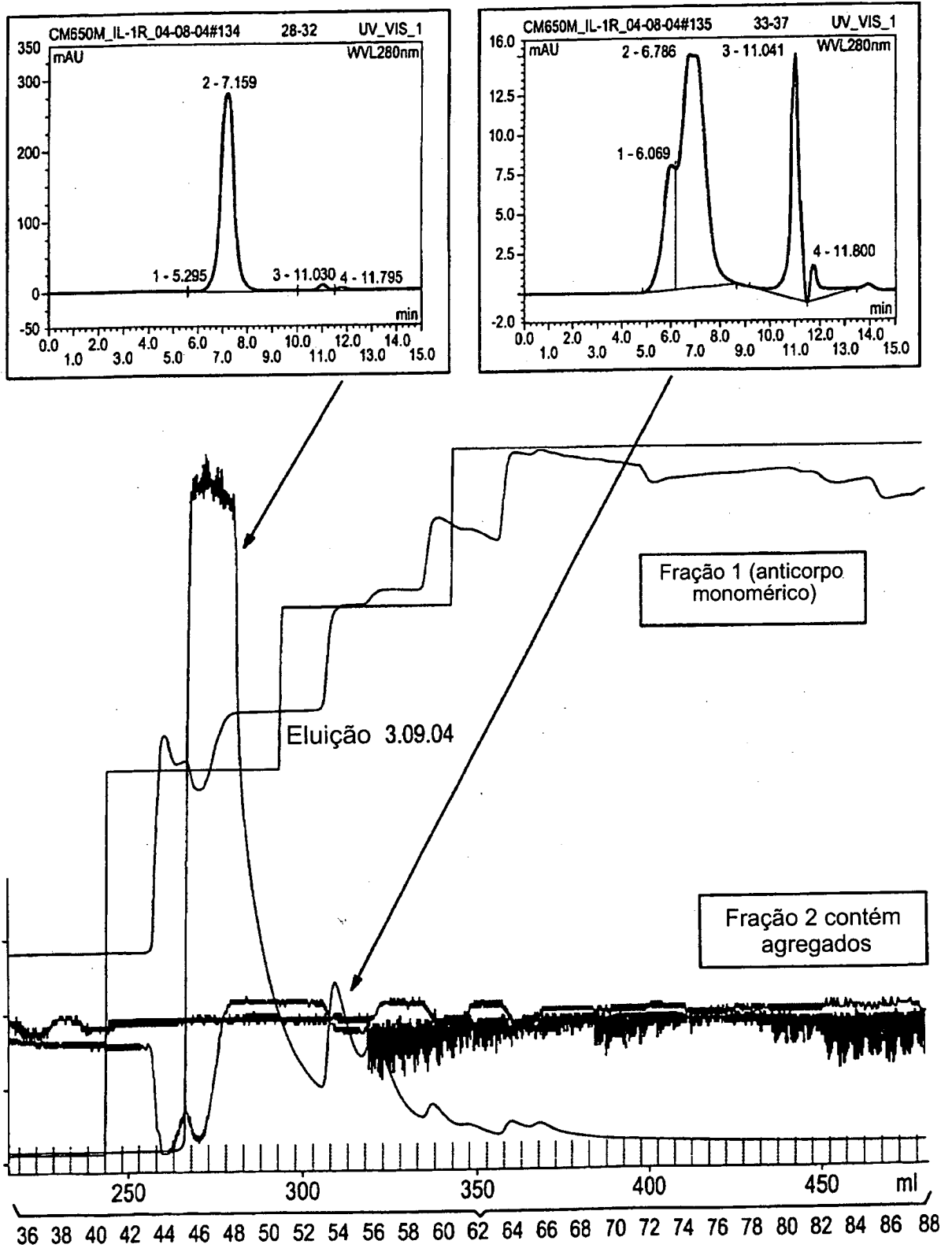
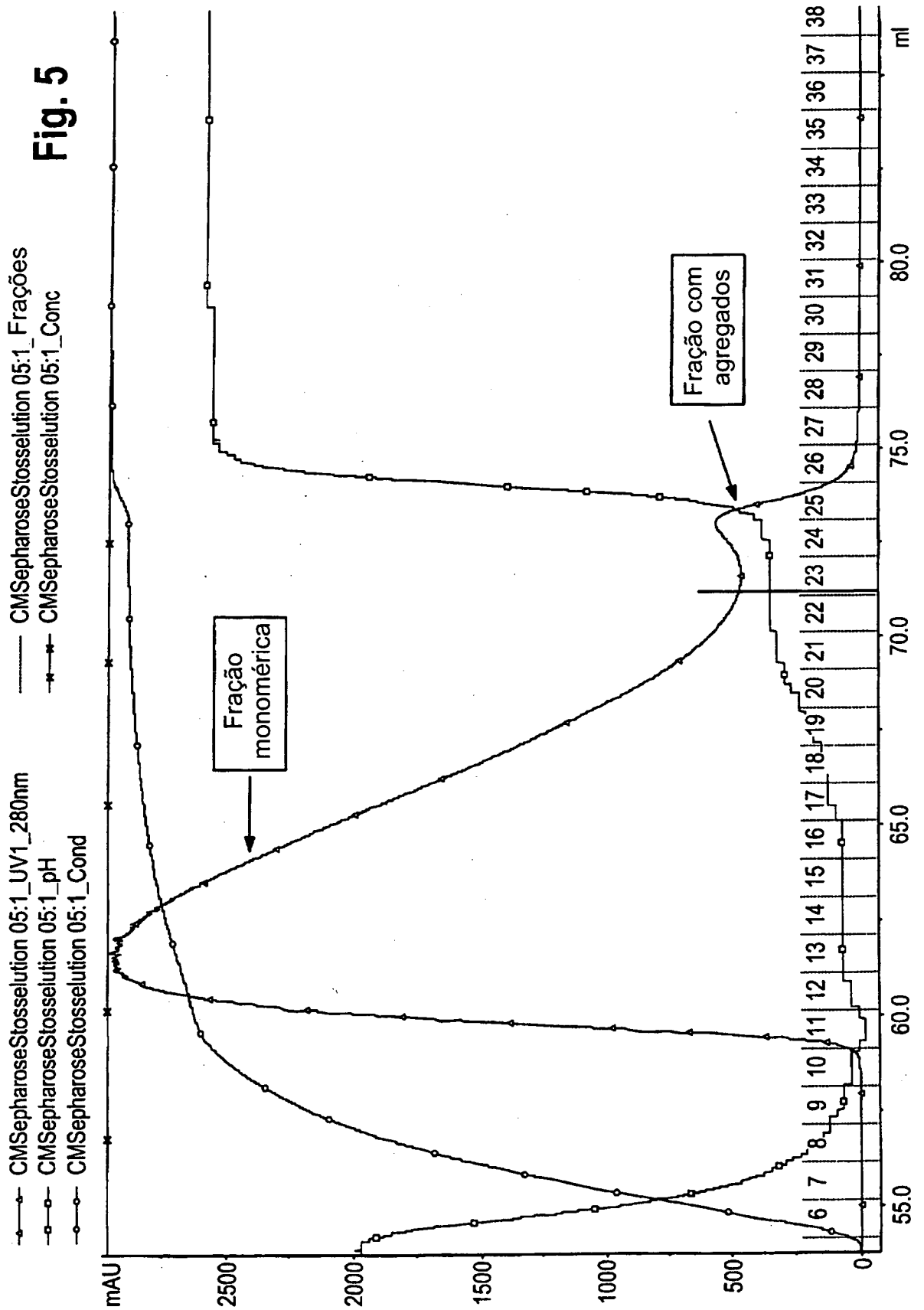


Fig. 4





6/20

- MS27CMseph1 die zweite 01:1_UV_280nm
- MS27CMseph1 die zweite 01:1_pH
- MS27CMseph1 die zweite 01:1_SetMark
- MS27CMseph1 die zweite 01:1_Frações

Fig. 6a

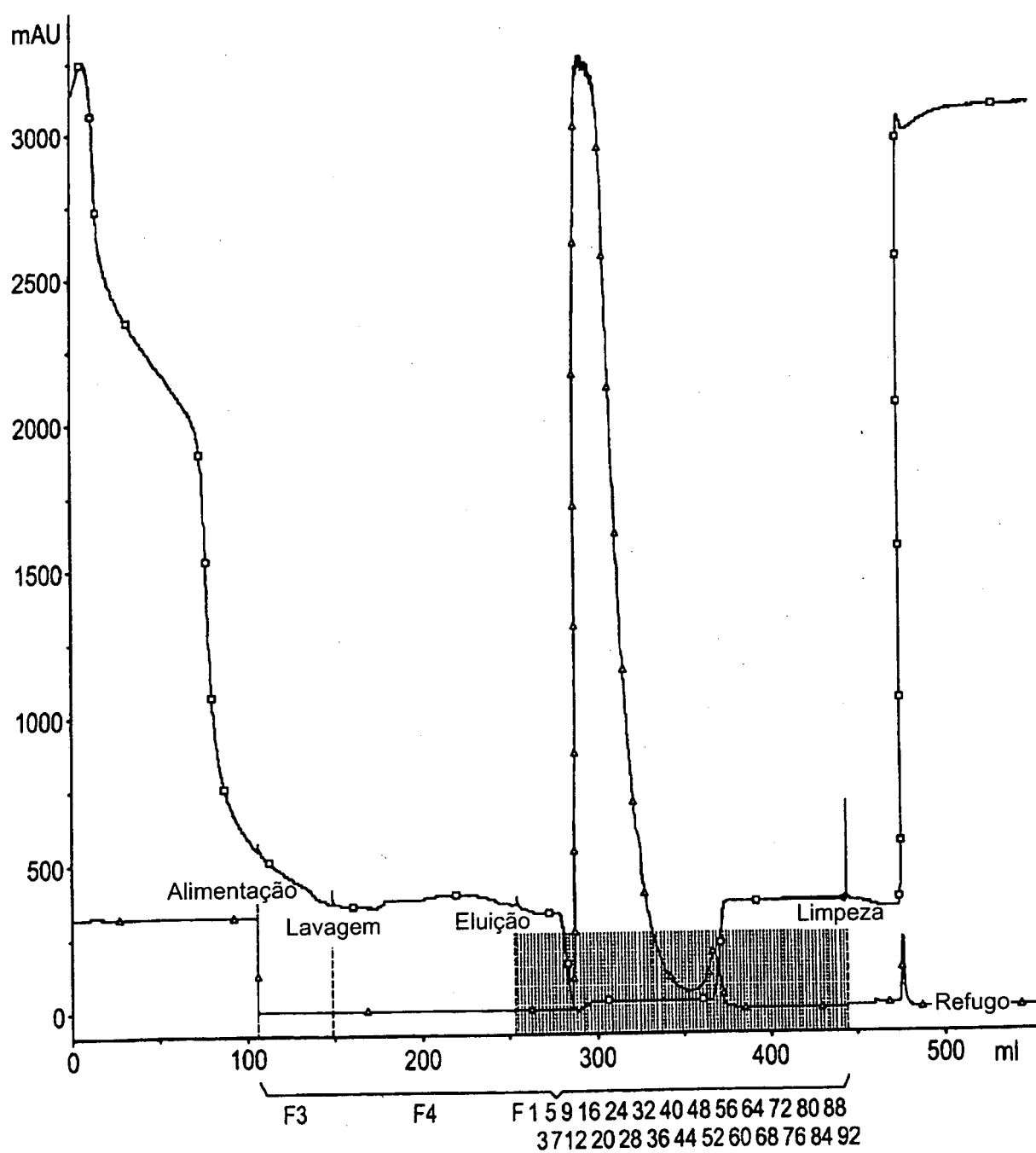
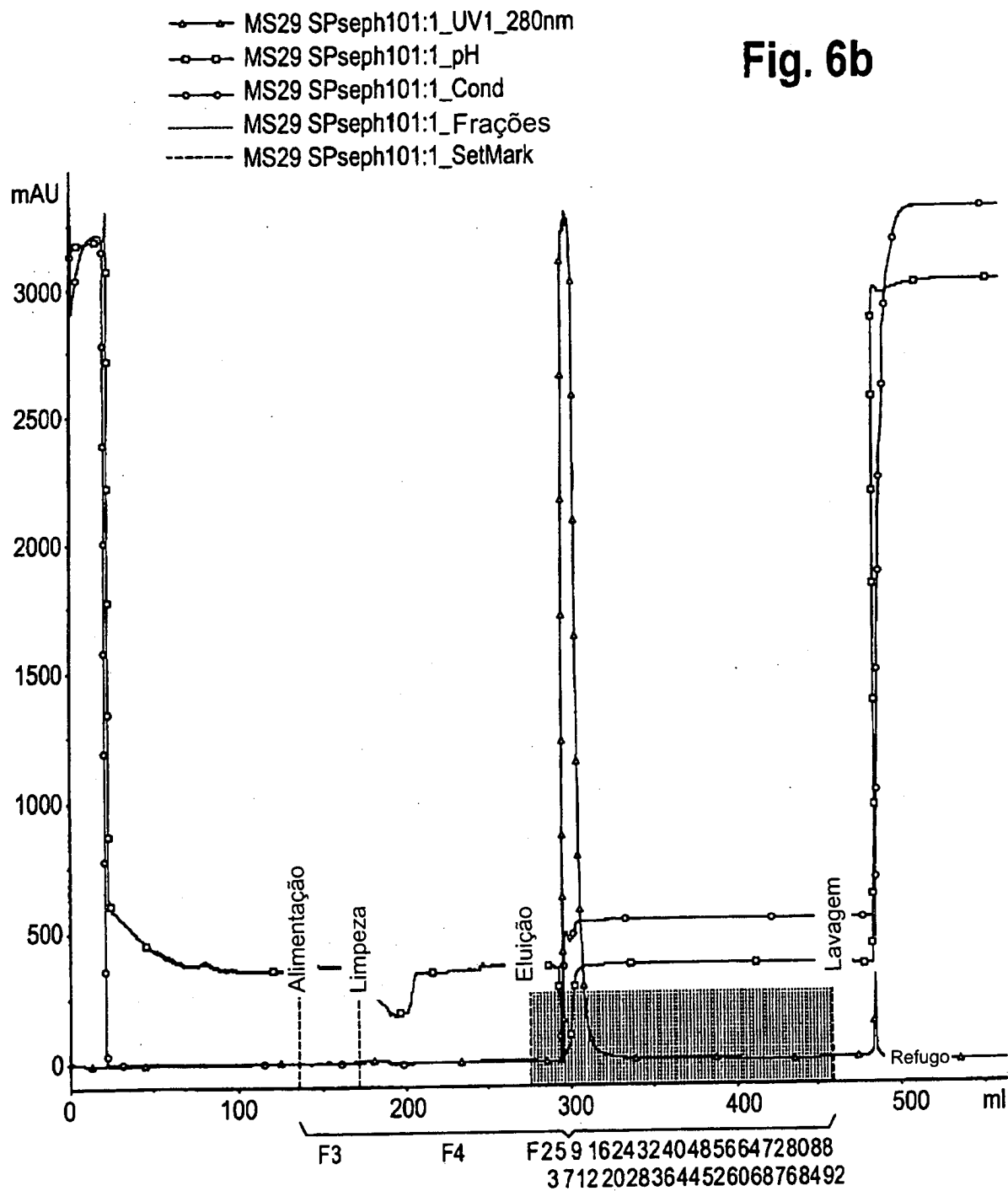


Fig. 6b



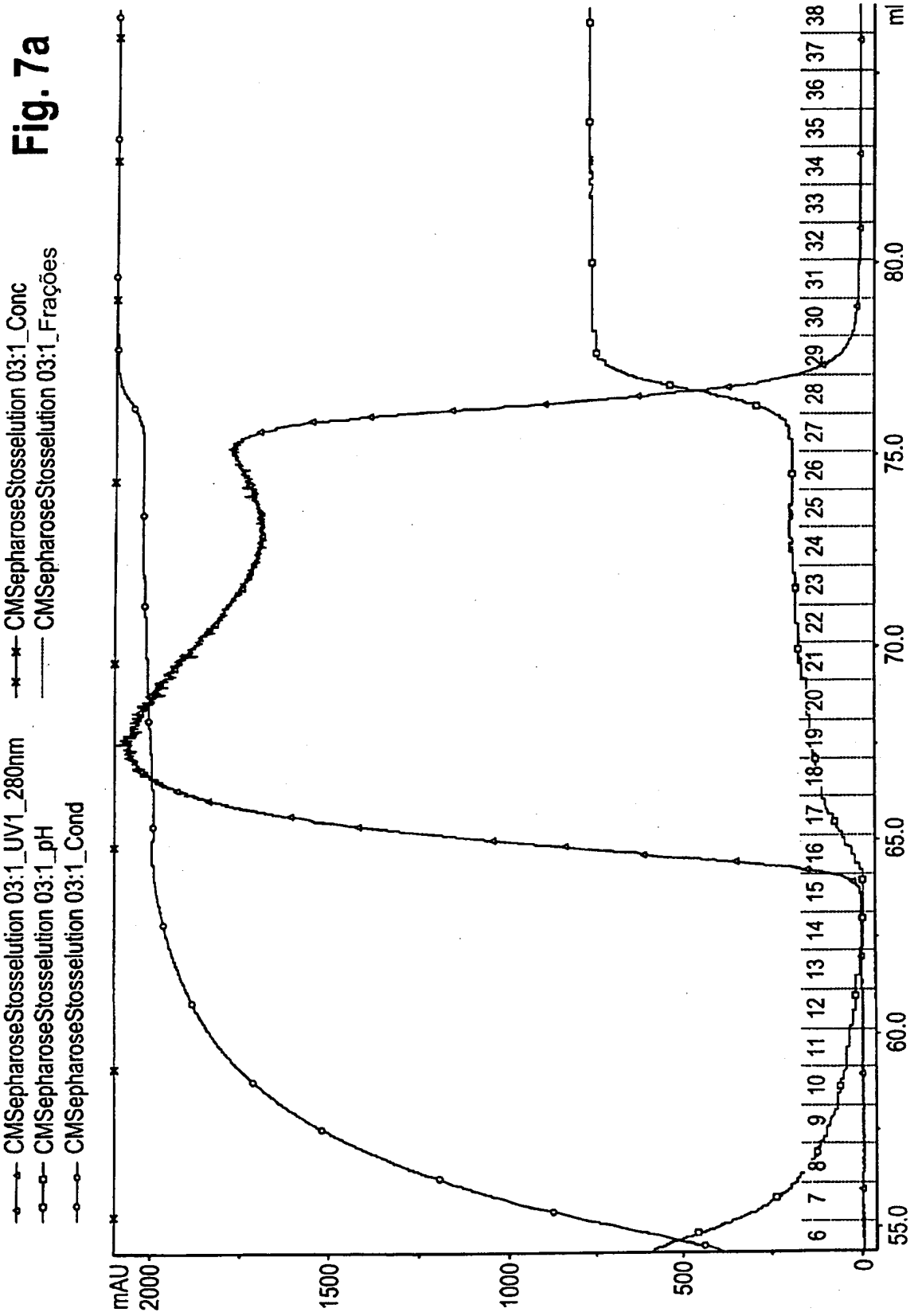
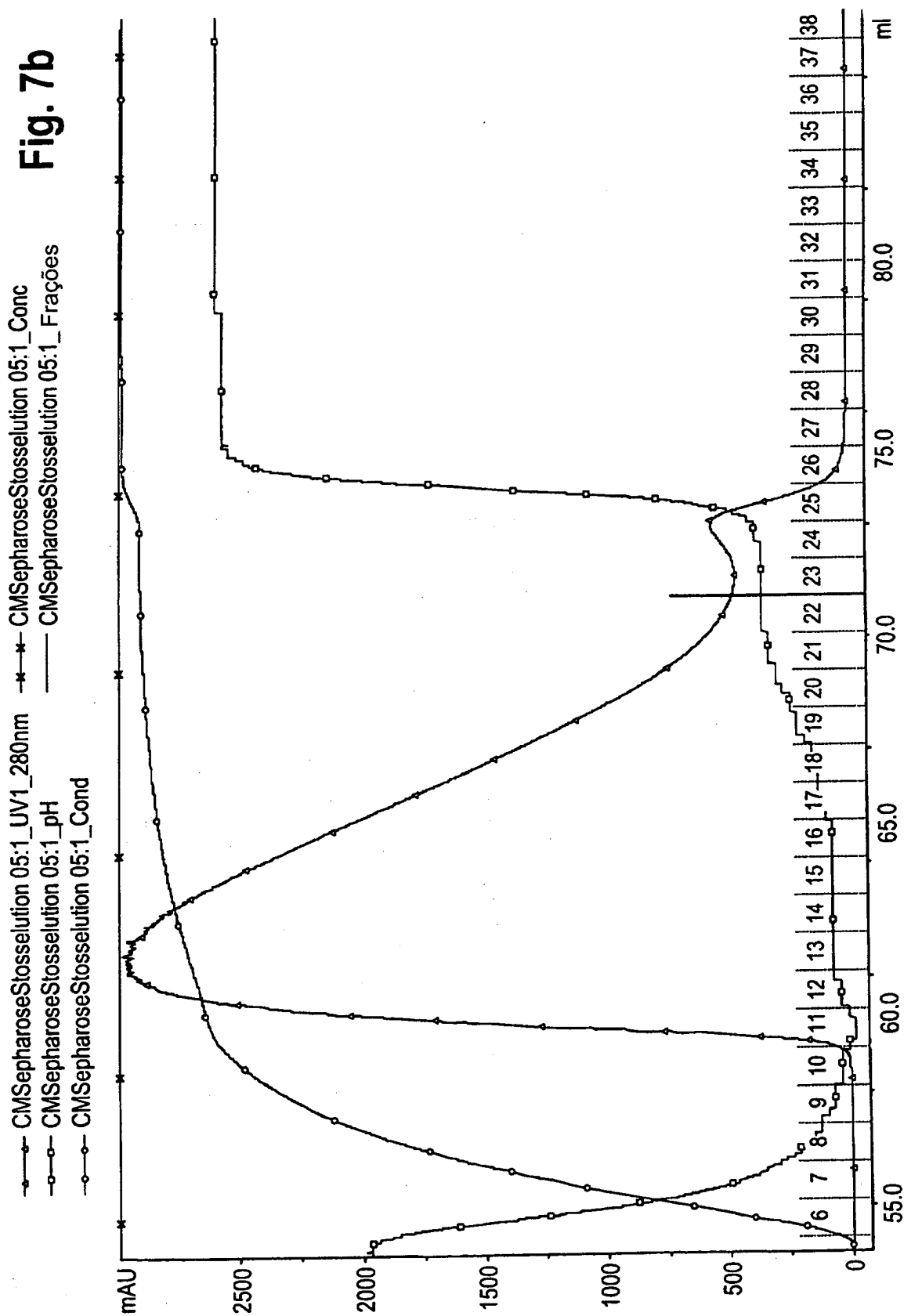


Fig. 7b



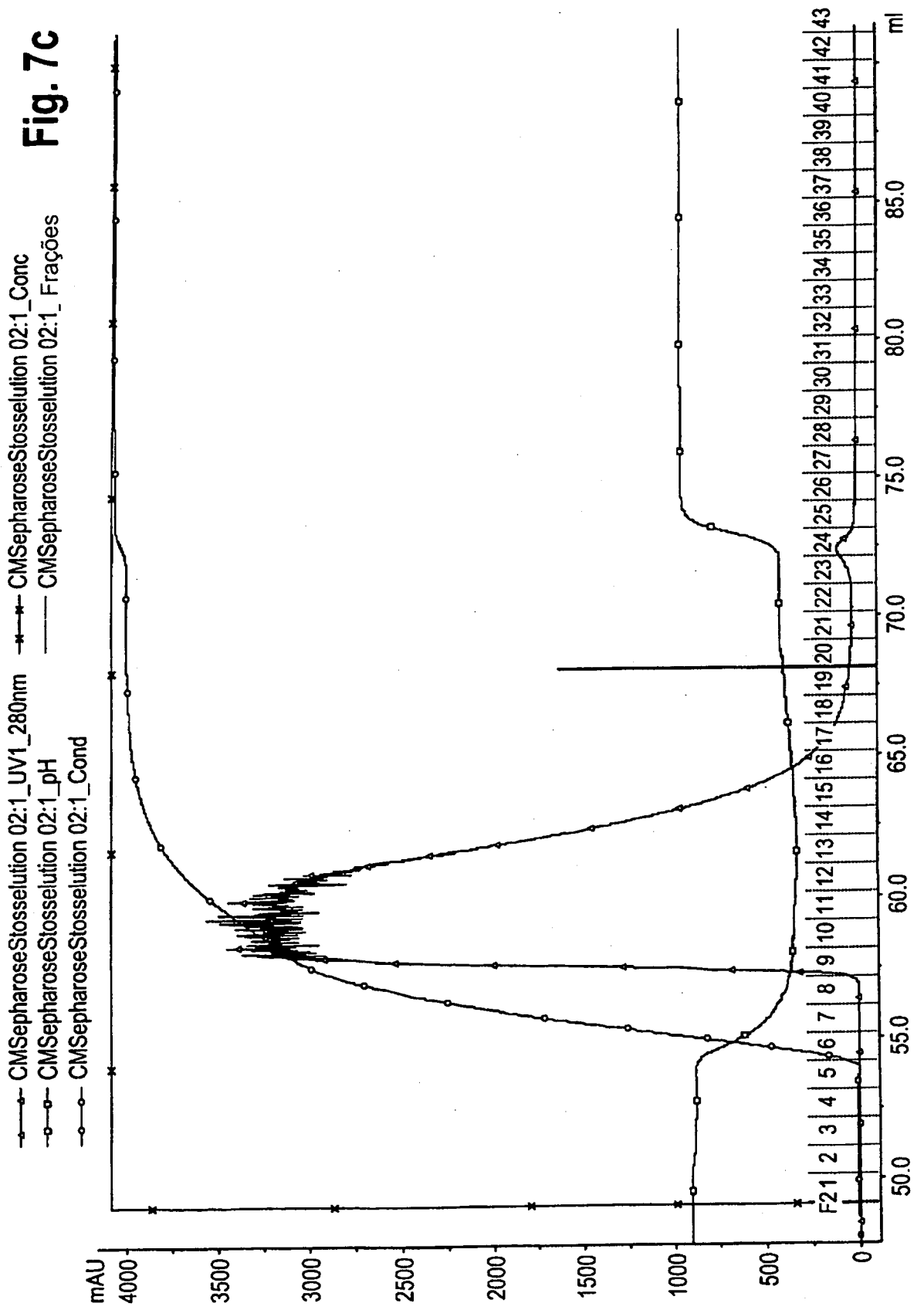
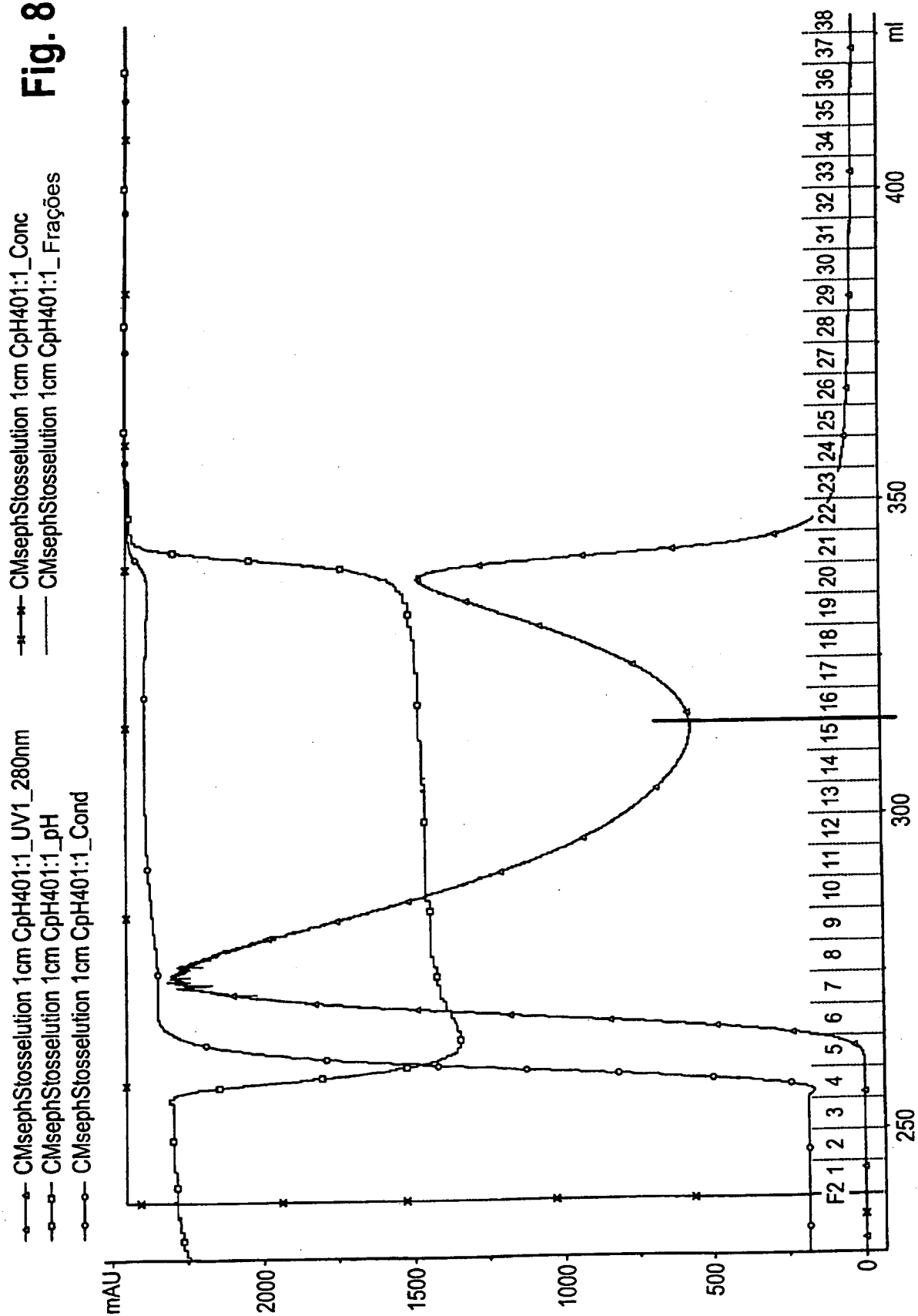
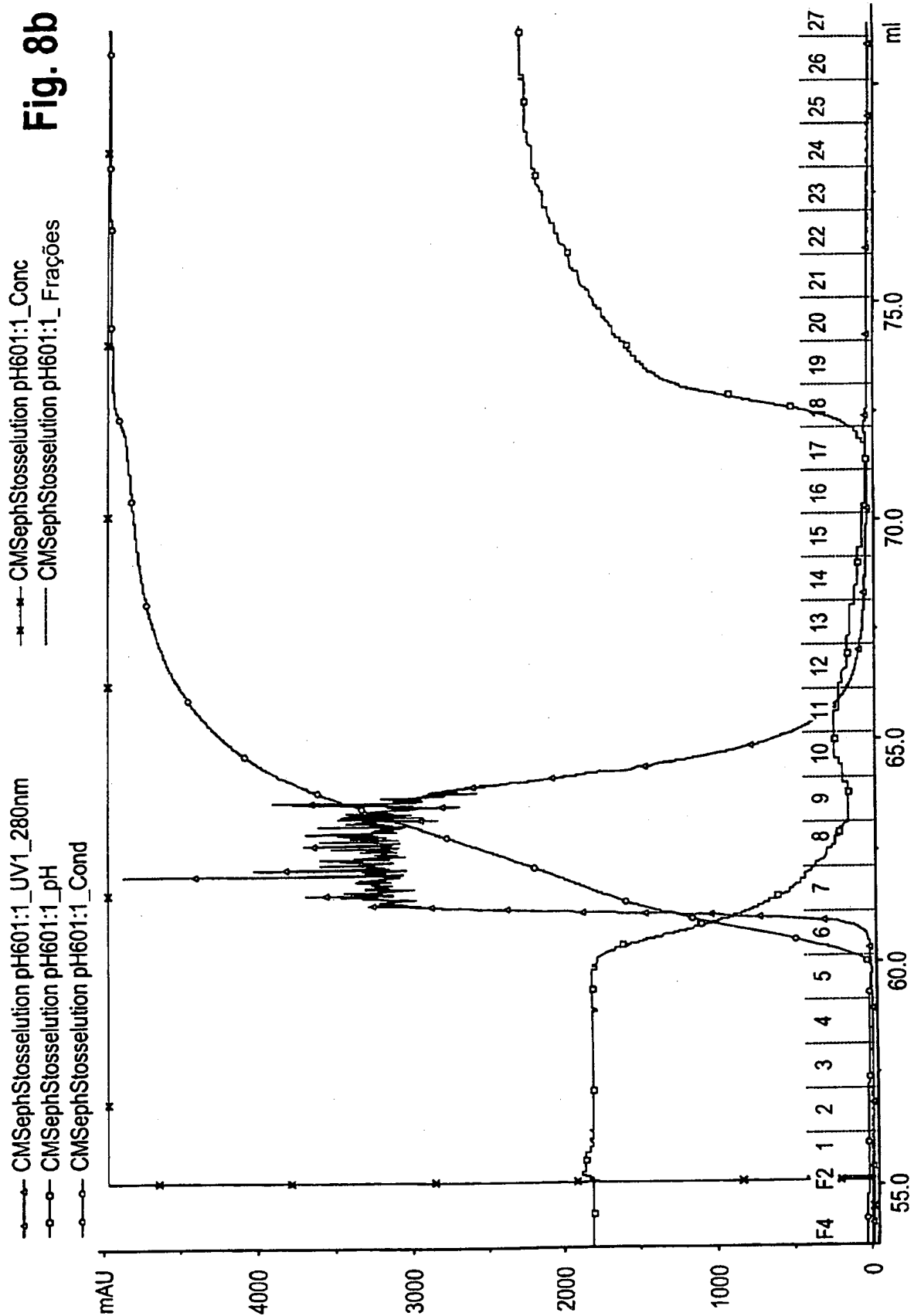


Fig. 8a





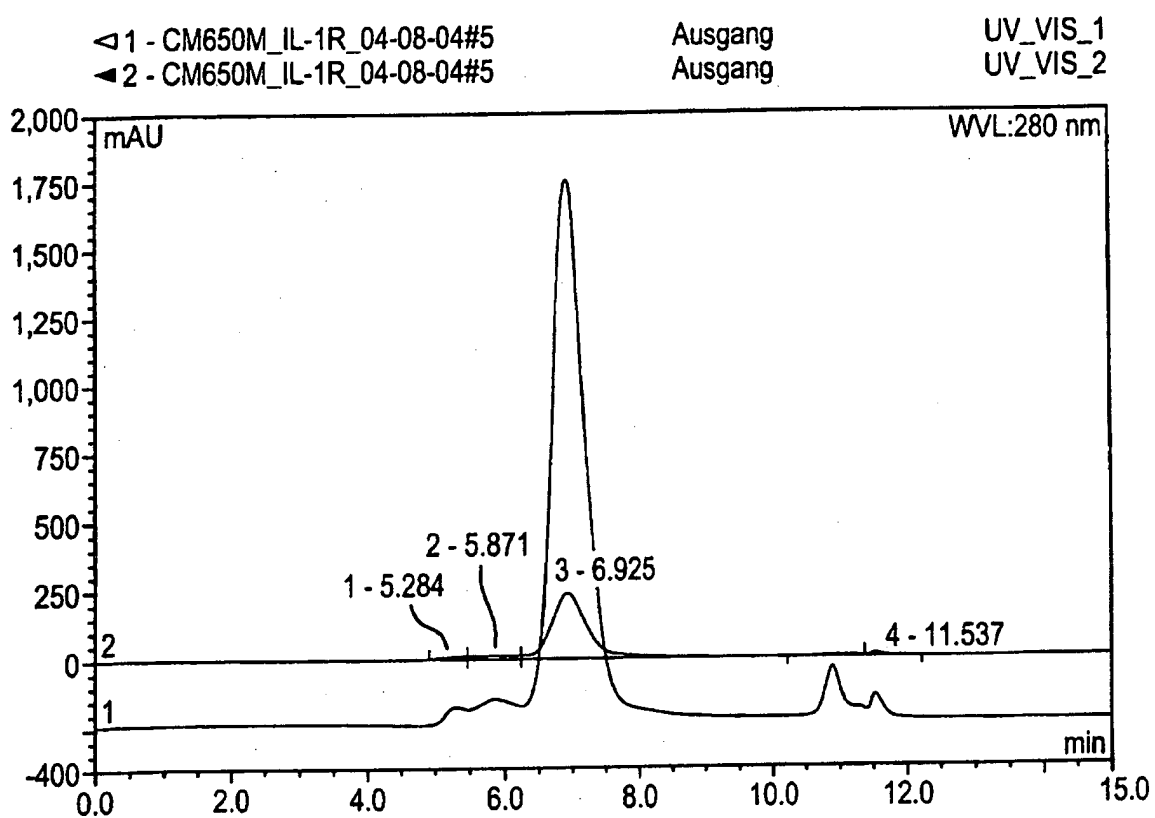


Fig. 9a

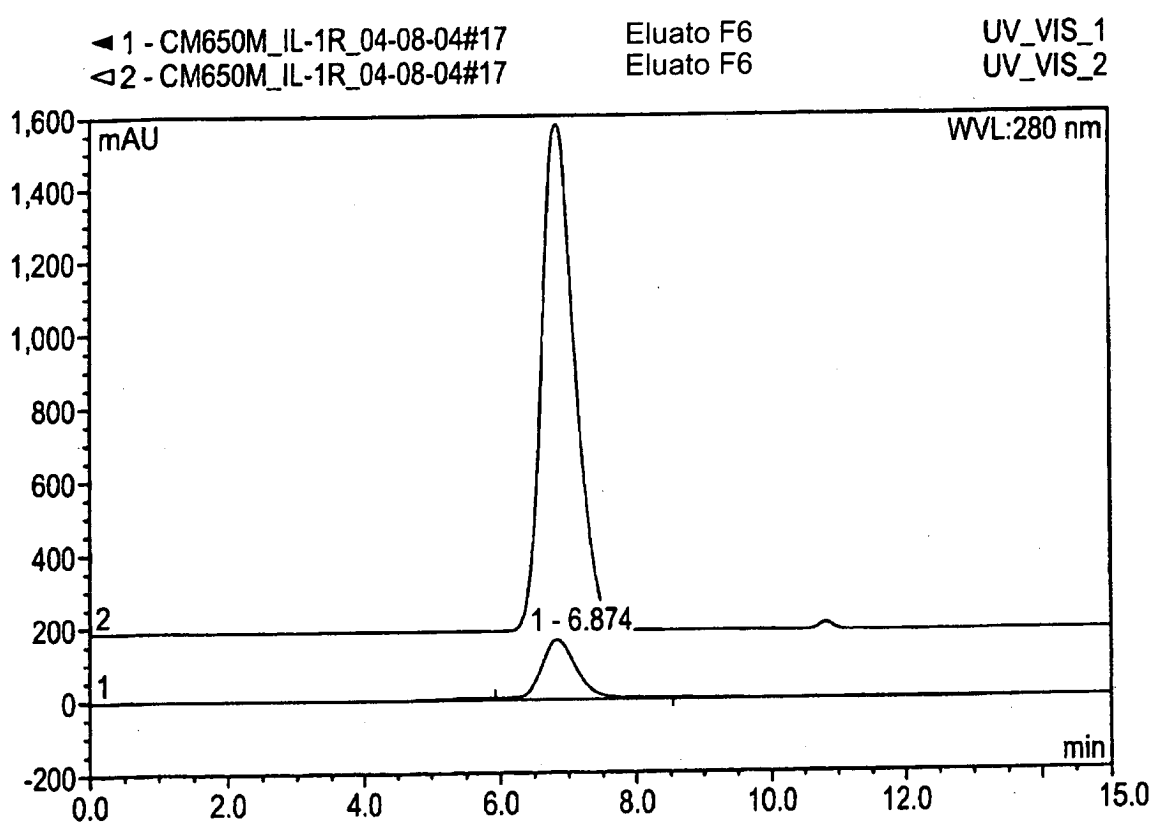


Fig. 9b

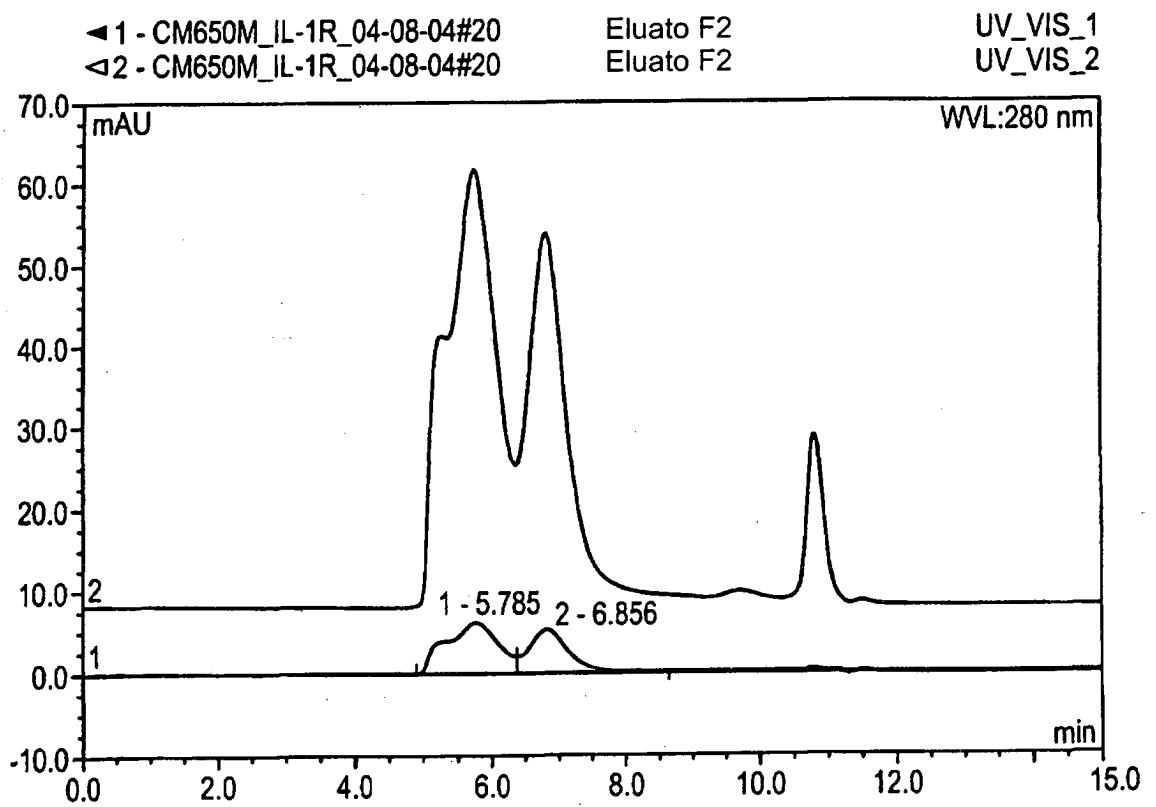
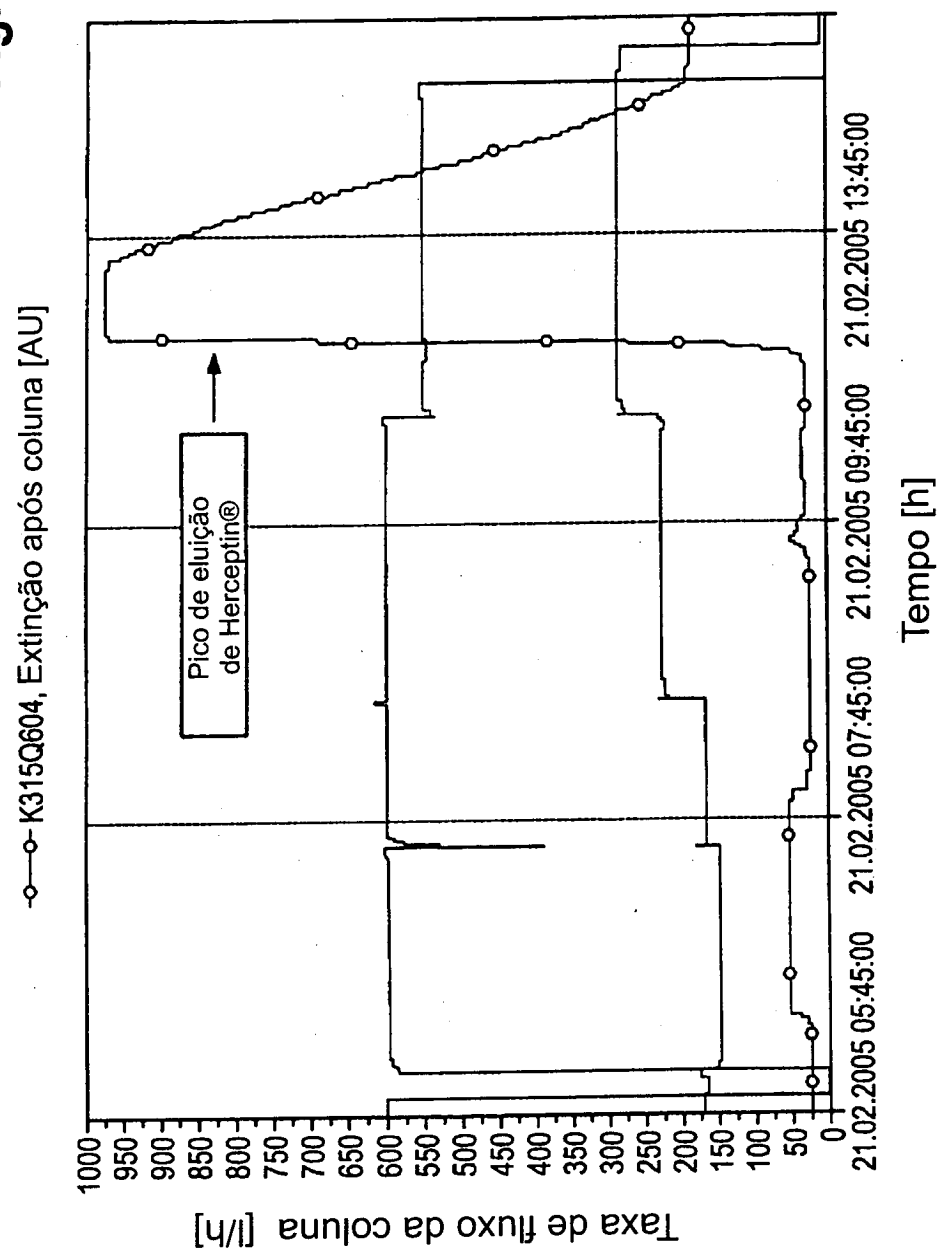
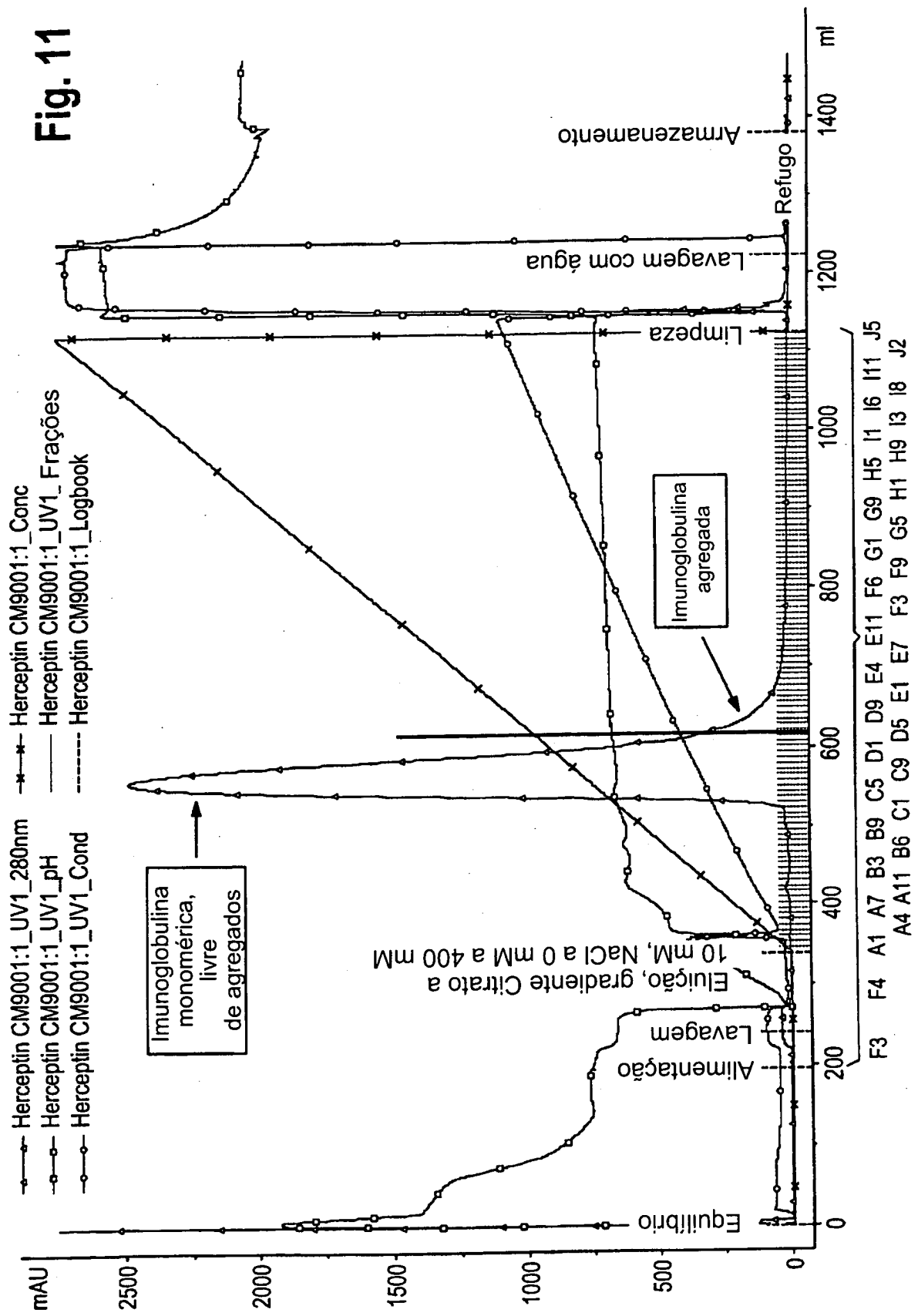
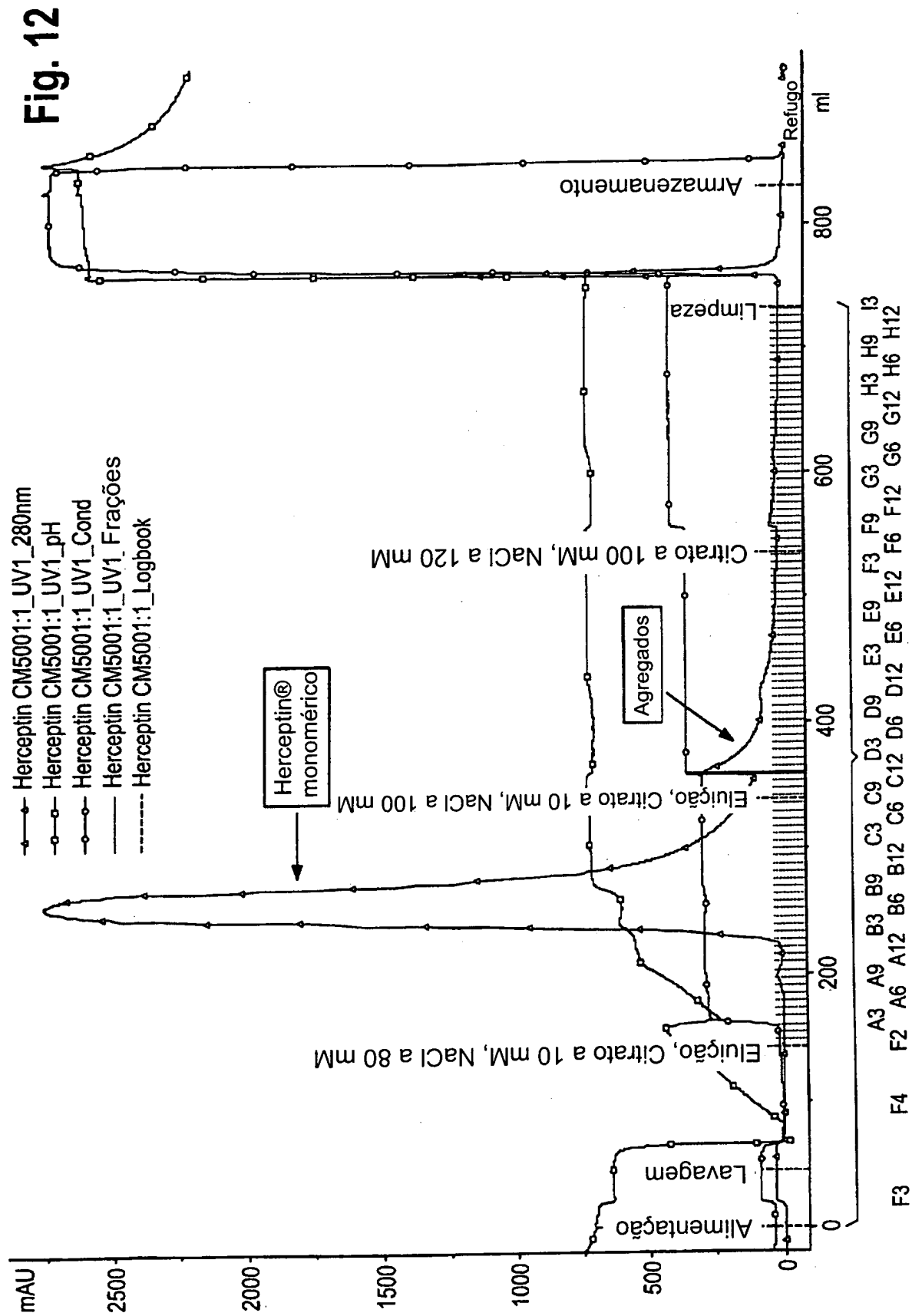


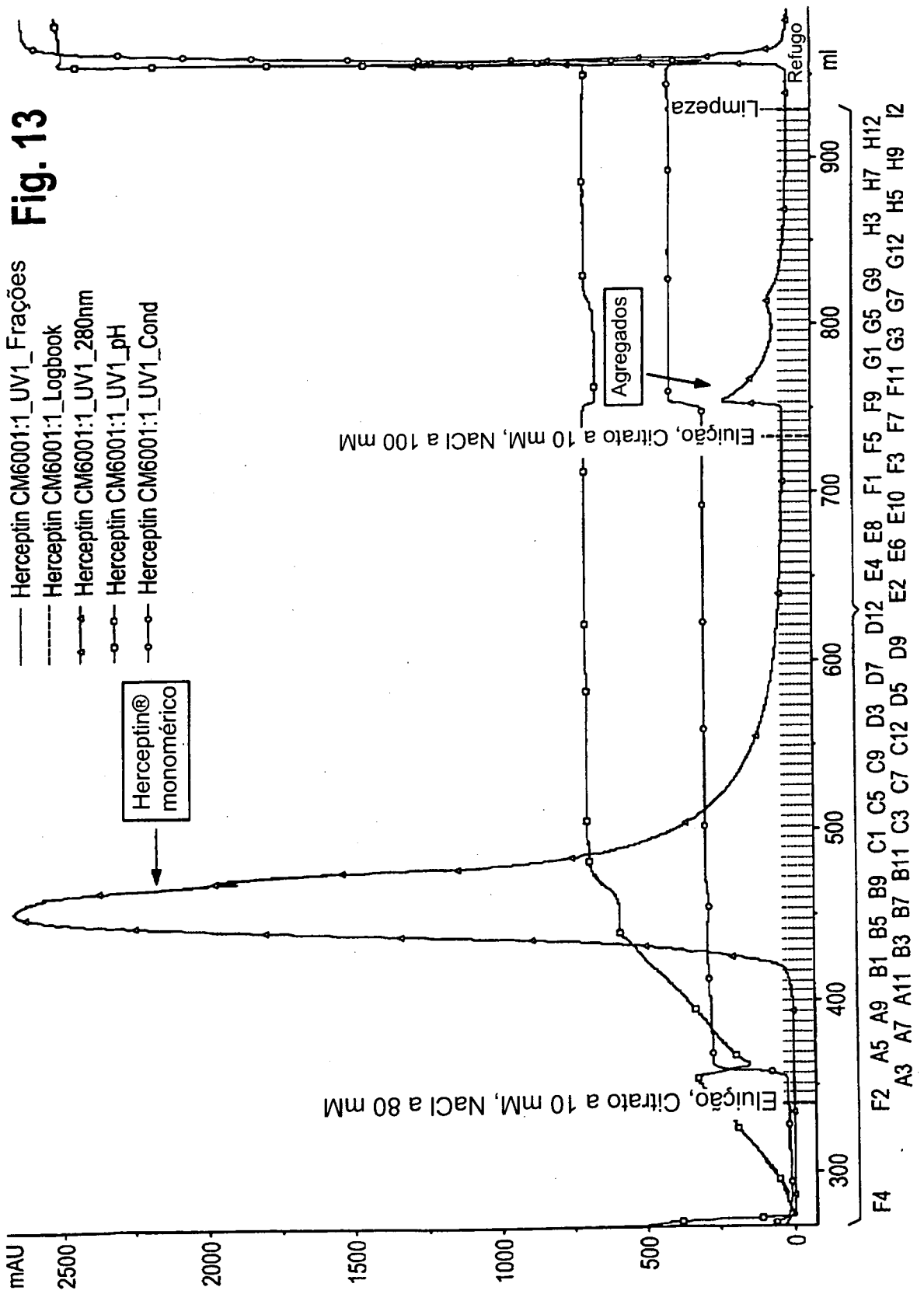
Fig. 9c

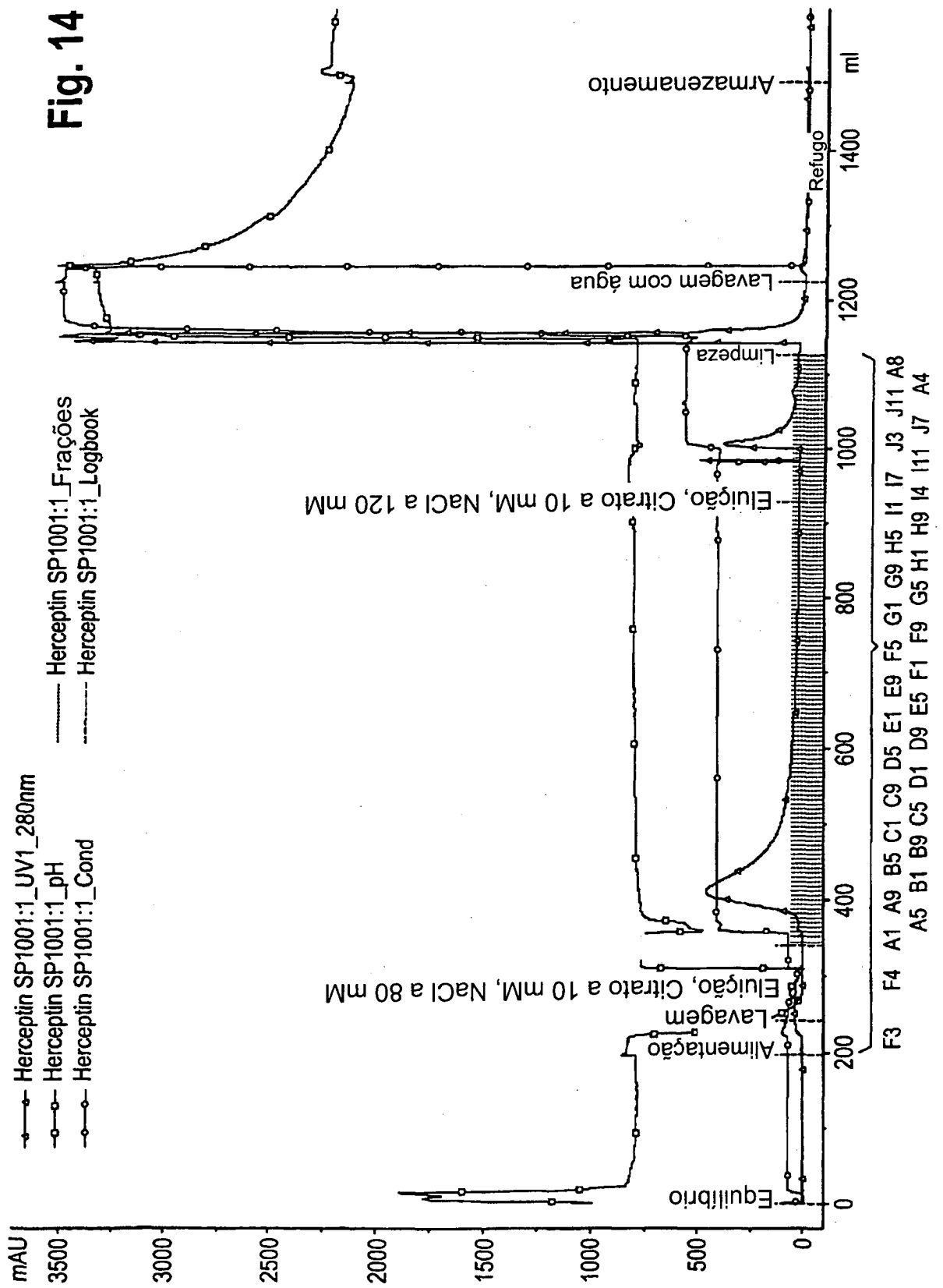
Fig. 10











RESUMO

Patente de Invenção: **"SACO COM DOBRAS LATERAIS COM FUNDO MÓVEL"**.

A presente invenção refere-se a um saco de dobras laterais (2)
 5 de material a base de poliolefina que abrange uma região do segmento tubu-
 lar (1) com as paredes frontais (5) e as paredes laterais do saco (2), sendo
 que as paredes laterais apresentam dobras laterais (4). Além disso, está
 também prevista uma região de fundo em uma extremidade da região do
 segmento tubular o qual apresenta ao menos uma dobra do material do
 10 segmento tubular de 180° ao redor de um eixo que se projeta essencialmen-
 te em sentido transversal para com as dobras laterais (4). É considerado
 como novo e inventivo uma folha (9) que encobre ao menos partes da região
 dobrada.

Novo quadro reivindicatório (total de 09 reivindicações), incorporando as emendas às reivindicações conforme relatório do Exame Preliminar.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificação de uma imunoglobulina, onde o método compreende:

5 a) provisão de uma solução compreendendo uma imunoglobulina, uma substância tampão e opcionalmente um sal;

b) trazer a solução e um material de troca de íon fraca em contato sob condições com o que a imunoglobulina se liga a um material de troca de íon fraca;

10 c) recuperação da imunoglobulina a partir do material de troca de íon fraca em uma etapa única usando uma solução compreendendo uma substância tampão e um sal.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a substância tampão é ácido cítrico ou um seu sal ou ácido fosfórico ou um sal do mesmo.

15 3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o método é um método cromatográfico ou em batelada.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o sal na etapa c) é selecionado do grupo consistindo em cloreto de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de potássio, sais de ácido cítrico, sais de ácido fosfórico e misturas desses componentes.

25 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a imunoglobulina é um membro da classe de imunoglobulina G ou E.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a solução na etapa de recuperação c) tem um valor de pH de a partir de pH 3,0 a pH 7,0.

30 7. Método para determinação da concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única compreendendo as duas etapas que seguem:

e 1,70;

com o que os fatores das etapas ii) e iii) são determinados como segue: em uma concentração de partida entre 10 mM e 40 mM os fatores são 1,35 e 1,70, respectivamente, em uma concentração de partida entre 40 mM e 70 mM os fatores são 1,30 e 1,60 respectivamente e em uma concentração de partida de mais de 70 mM os fatores são 1,25 e 1,50 respectivamente;

5 b3) determinação em qual subetapa do método de eluição de três etapas da etapa b2) o polipeptídeo é eluído da coluna de troca de íon deste modo determinando a concentração de um sal para eluição de um polipeptídeo a partir de um material de cromatografia de troca de íon em um processo de purificação de etapa única.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o material de cromatografia de troca de íon é um material de cromatografia de troca de íon fraco.

15 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 8, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é uma imunoglobulina.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE ANTICOR-
POS".

5 A presente invenção refere-se a método para a purificação de
imunoglobulinas através de cromatografia de troca de íon que é descrito. O
método cromatográfico usa uma resina de troca de íon fraca e um processo
de eluição de etapa única para a purificação de uma imunoglobulina. Adicio-
nalmente um método para a determinação da concentração de sal para a
10 eluição de etapa única de uma imunoglobulina a partir de uma resina de tro-
ca de íon é descrito.