

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 723**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/16** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2017 E 20179961 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023 EP 3730511**

54 Título: **Purificación de proteínas**

30 Prioridad:

**19.02.2016 GB 201602938**

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

**06.03.2024**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)**

**Allée de la Recherche 60**

**1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**ROSE, MICHAEL HARRY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 960 723 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 proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la purificación de proteínas. De manera más específica, se refiere a un proceso para la purificación de una proteína de interés, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo utilizando una etapa de cromatografía semicontinua.

10

**Antecedentes de la invención**

La purificación de proteínas a gran escala y económica es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. En general, las proteínas se producen mediante cultivo celular, utilizando líneas celulares de mamíferos o bacterias genomanipuladas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen de esa proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento. La proteína de interés debe aislarse de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células (corriente de alimentación) hasta alcanzar una pureza suficiente para usar como tratamiento terapéutico humano. Los criterios establecidos por las autoridades sanitarias para las proteínas destinadas a la administración humana con respecto a las impurezas de la corriente de alimentación son muy altos. Muchos métodos de purificación de proteínas conocidos en la materia contienen etapas que requieren la aplicación, por ejemplo, de pH bajo o alto, alta concentración de sal u otras condiciones extremas que puedan comprometer irreversiblemente la actividad biológica de la proteína a purificar y, por tanto, no son adecuados. Por tanto, la separación de la proteína deseada hasta alcanzar una pureza suficiente plantea un desafío extraordinario. Históricamente, los esquemas de purificación de proteínas se han basado en diferencias en las propiedades moleculares de tamaño, carga y solubilidad entre la proteína a purificar y los contaminantes proteicos no deseados. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, precipitación diferencial y similares.

15

20

25

30

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos tienen una importancia creciente en una variedad de áreas terapéuticas. Uno de los métodos más importantes para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos es mediante tecnología recombinante. Dichas técnicas utilizan una célula hospedadora para expresar el anticuerpo deseado, o uno, que luego se separa del medio de producción y se purifica.

35

Los anticuerpos requieren glucosilación y, por lo tanto, generalmente se expresan en sistemas de expresión eucariotas que emplean células eucariotas, en particular células de mamífero tales como células CHO, PER.C6, NS0, BHK o Sp2/0. En los sistemas de expresión eucariotas, la proteína de interés expresada, tal como un anticuerpo, generalmente se secreta en el medio de cultivo celular. Posteriormente, el medio se puede separar fácilmente de las células secretoras de proteínas, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración.

40

Casi todas las plataformas industriales de purificación de anticuerpos actuales utilizan proteína A. La proteína A es una proteína de la superficie celular que se encuentra en la pared celular de las bacterias *Staphylococcus aureus* que se une a la porción Fc de una inmunoglobulina de mamífero. La proteína A tiene una alta afinidad por los anticuerpos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> humanos y una afinidad moderada por los IgM, IgA e IgE humanos. Por consiguiente, la purificación de la proteína A no es adecuada para fragmentos de anticuerpos que carecen de la porción Fc.

45

La cromatografía de afinidad separa proteínas basándose en una interacción reversible entre una proteína (o grupo de proteínas) de interés y un ligando específico acoplado a una matriz cromatográfica. La interacción entre la proteína de interés y el ligando acoplado a la matriz cromatográfica puede ser el resultado de interacciones electrostáticas o hidrófobas, fuerzas de Van der Waals y/o enlaces de hidrógeno. Para eluir la molécula diana del medio de afinidad, la interacción se puede revertir, ya sea usando un ligando competitivo específicamente, o no específicamente, cambiando el pH, fuerza iónica o polaridad. La purificación por afinidad requiere un ligando que se pueda unir covalentemente a una matriz cromatográfica. El ligando acoplado debe conservar su afinidad de unión específica por las moléculas diana y, después de lavar el material no unido, la unión entre el ligando y la molécula diana debe ser reversible para permitir que las moléculas diana se eliminen en forma activa. A pesar de su uso común, la cromatografía de afinidad es costosa, particularmente a escala industrial necesaria para purificar proteínas terapéuticas.

50

55

La cromatografía de intercambio iónico se puede utilizar para purificar moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas se separan basándose en la interacción electrostática inespecífica de sus grupos cargados con moléculas con carga opuesta unidas a la matriz de soporte en fase sólida, retrasando así aquellas moléculas ionizadas que interactúan más fuertemente con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de molécula ionizada y su afinidad por la matriz varía de acuerdo con la cantidad de grupos cargados, la carga de cada grupo y la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz de fase sólida cargada. Estas diferencias dan como resultado la resolución de varios tipos de moléculas mediante cromatografía de intercambio iónico. La elución de moléculas que están unidas a la fase

60

65

sólida se logra generalmente mediante el aumento de la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y, por lo tanto, alterar la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio de conductividad o pH puede ser gradual (elución en gradiente) o escalonado (elución escalonada). Se conocen dos tipos generales de interacción:

5 Cromatografía de intercambio aniónico mediada por cadenas laterales de aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico) que interactúan con superficies con carga positiva y cromatografía de intercambio catiónico mediada por restos de aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, lisina y arginina) que interactúan con superficies con carga negativa. Los intercambiadores de aniones se pueden clasificar como débiles o fuertes. El grupo de carga en un intercambiador de aniones débil es una base débil, que se desprotona y, por lo tanto,

10 pierde su carga a pH alto. La dietilaminoetil (DEAE)-celulosa es un ejemplo de un intercambiador de aniones débil, donde el grupo amino puede cargarse positivamente por debajo de pH ~ 9 y pierde gradualmente su carga a valores de pH más altos. Por ejemplo, la DEAE o el dietil-(2-hidroxipropil) aminoetilo (QAE) tienen cloruro como contraión.

Una alternativa a la elución mediante el aumento de la fuerza iónica del tampón de elución (cromatografía de elución) es la elución utilizando moléculas que tienen una mayor afinidad dinámica por la fase estacionaria que la proteína unida. Este modo de realizar la cromatografía de intercambio iónico se denomina cromatografía de desplazamiento. La cromatografía de desplazamiento es fundamentalmente diferente de cualquier otro modo de cromatografía en que los solutos no se desorben en el modificador de fase móvil y se separan mediante diferencias en las tasas de migración. En desplazamiento, las moléculas se ven obligadas a migrar hacia abajo de la columna cromatográfica por una onda de choque de avance de una molécula desplazadora que tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria que cualquier componente de la corriente de alimentación. Es esta migración forzada la que da como resultado concentraciones y perezas de producto más altas en comparación con otros modos de funcionamiento de alta retención, seguida de una infusión constante de una solución de desplazador en la columna.

25 Las matrices cromatográficas utilizadas para las distintas técnicas de cromatografía, particularmente para procesos de purificación a gran escala industrial, son muy caras. Generalmente se reutilizan después de la limpieza. Debido a la naturaleza agresiva de los agentes de limpieza utilizados, la eficacia de la matriz cromatográfica disminuye con el tiempo. Normalmente, las matrices cromatográficas no se utilizan de forma muy eficaz en la materia ya que no se aprovecha su capacidad máxima total de unión a proteínas. En la materia, las matrices cromatográficas se utilizan de manera que se cargan con proteína de interés por debajo de su capacidad total para mejorar los rendimientos. Cuando las matrices de proteínas se cargan con proteína de interés a su capacidad total, se pierde mucha proteína de interés en el flujo continuo. Debido a los altos costes y la duración limitada de las matrices cromatográficas, existe una necesidad en la materia de procesos que utilicen de manera óptima una matriz cromatográfica.

35 Las preparaciones de proteína bruta de procesos de cultivo celular a gran escala normalmente no se pueden purificar en un solo ciclo de purificación. Debido a la cantidad de proteína a purificar, se requieren varios ciclos del mismo proceso de purificación para purificar el producto del cultivo celular. Por lo tanto, la mezcla de proteínas a purificar se purifica con frecuencia lote a lote en múltiples ciclos de purificación que implican también múltiples ciclos de cromatografía. También se han implementado procesos continuos en procesos de fabricación a gran escala de productos biofarmacéuticos. En cromatografía continua, varias columnas idénticas están conectadas en una disposición que permite que las columnas funcionen en serie y/o en paralelo, dependiendo de los requisitos del método. En comparación con la cromatografía de una sola columna o discontinua, en donde un solo ciclo de cromatografía se basa en varias etapas consecutivas, tales como cargar, lavar, elución y regeneración, en la cromatografía continua basada en múltiples columnas idénticas, todas estas etapas ocurren simultáneamente, pero

45 en columnas diferentes cada una. El funcionamiento de la cromatografía continua da como resultado una mejor utilización de la resina de cromatografía, tiempo de procesamiento reducido y requisitos de tampones reducidos, todo lo cual beneficia la economía del proceso. Una forma específica de hacer funcionar la cromatografía continua se llama cromatografía de lecho móvil simulado (SMB, por sus siglas en inglés). En la cromatografía de lecho móvil simulado, todas las columnas cromatográficas que comprende el sistema se mueven periódica y simultáneamente en la dirección opuesta al flujo de la muestra. El movimiento de las columnas se realiza mediante redirecciones apropiadas de la corriente de entrada y salida hacia/desde las columnas, lo que requiere una configuración sofisticada.

En la materia se ha descrito un proceso de cromatografía semicontinua mediante el cual, en lugar de una única columna cromatográfica grande, se utilizaron múltiples columnas más pequeñas en fila y cargadas con una capacidad de unión mayor. El flujo continuo de cada columna se cargó directamente en la siguiente columna. Como alternativa, el flujo continuo de la primera columna se dirigió de regreso al primer recipiente que contenía una mezcla con la proteína de interés y luego se volvió a cargar en la primera columna (Mahajan, George *et al.* 2012).

60 El uso de varias columnas cromatográficas en fila requiere sofisticados aparatos de control de flujo y un programa informático de control, así como un equipo adicional de cromatografía que incluye bombas, válvulas, detectores y carcasa para cada columna adicional, que añaden coste, aumentan la probabilidad de fallo de piezas, aumentan la complejidad de los procesos de validación y complican el diagnóstico de errores. Adicionalmente, para alinear el flujo continuo de una columna al período correcto en la secuencia para la columna receptora contigua, deben introducirse períodos de retraso de manera que coincidan, lo que reduce la velocidad operativa. Dado que cada columna receptora

65 adicional debe iniciarse y detenerse en una secuencia escalonada, lo que da como resultado columnas que están inactivas durante estos períodos, se incurre en una penalización de productividad adicional cada vez que se apaga o

se reinicia el funcionamiento. La solicitud internacional WO2014/158231 A1 divulga la reutilización de las soluciones de lavado en la cromatografía normal en modo unión y elución.

5 Por lo tanto, todavía existe una necesidad en la materia de procesos simples, eficaces y rentables para la purificación de proteínas que implican el uso de matrices cromatográficas.

### Sumario de la invención

10 La presente invención aborda la necesidad identificada anteriormente proporcionando un proceso novedoso para la purificación de una proteína de interés que implica un uso más eficaz y rentable de matrices cromatográficas mientras se mantiene o mejora el rendimiento y la pureza de la proteína purificada.

15 Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de

20 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar un primer volumen de una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que la proteína se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad máxima de unión estática de la matriz cromatográfica;

b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

25 c) en un ciclo de cromatografía operativo adicional, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente y cargar un segundo volumen de la proteína de interés del primer recipiente a la misma matriz cromatográfica operada de manera que la proteína de interés se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica,

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de:

35 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar un primer volumen de una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica;

b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

40 c) en un ciclo de cromatografía operativo adicional, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente y cargar un segundo volumen de la proteína de interés desde el primer recipiente a la misma matriz cromatográfica operada de manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica.

45 En una realización adicional, la invención proporciona un proceso de acuerdo con el segundo aspecto, en donde en la etapa (a) la carga de la proteína de interés se detiene cuando se alcanza al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la capacidad máxima de unión estática.

50 En una realización adicional del primer o segundo aspecto, la invención proporciona un proceso, en donde la recogida del flujo continuo se inicia en una primera concentración predeterminada de la proteína de interés en el flujo continuo y se detiene en una segunda concentración predeterminada de la proteína de interés en el flujo continuo.

55 En una realización adicional del primer o segundo aspecto, la invención proporciona un proceso, en donde la cromatografía se selecciona de cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto, tal como cromatografía de hidroxipatita, cromatografía quiral o cromatografía dieléctrica.

60 En una realización adicional del primer o segundo aspecto, la invención proporciona un proceso, en donde una, dos, tres o todas las matrices cromatográficas para una, dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía son columnas cromatográficas.

En una realización adicional del primer o segundo aspecto, la invención proporciona un proceso, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

65 En una realización adicional del primer o segundo aspecto, la invención proporciona un método de fabricación de una proteína de interés que comprende el proceso de purificación de acuerdo con las realizaciones de la invención.

En otra realización del primer o segundo aspecto, la invención proporciona una proteína obtenida mediante el método de fabricación de una proteína de interés que comprende el proceso de purificación de acuerdo con las realizaciones de la invención

## 5 Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la configuración del proceso semicontinuo. Varios componentes de tampón líquido se mantienen en depósitos y se bombean secuencialmente mediante una válvula a través de una matriz cromatográfica porosa. Después de salir de la matriz, el flujo continuo pasa a través de un detector que analiza el flujo continuo. El flujo continuo se dirige luego a la recolección si contiene proteína de interés en una cantidad apropiada o a los desechos. En la presente invención, el flujo continuo puede dirigirse alternativamente a un depósito de reciclaje separado. El contenido de este depósito puede luego bombearse secuencialmente de nuevo a la matriz cromatográfica junto con una carga nueva en uno de los siguientes ciclos de cromatografía operativos.

15 La Figura 2 muestra la distribución de la concentración de proteína de interés (compuesto diana) cuando se sobrecarga la matriz cromatográfica. Cuando se carga una matriz cromatográfica inmovilizada en condiciones dinámicas, tales como a través del flujo continuo de material de carga, el compuesto diana deseado en la corriente está de manera inicial unido completamente mediante la matriz. Sin embargo, a medida que la capacidad de la matriz para el compuesto diana se llena progresivamente, parte del compuesto diana se une y parte se escapa y fluye junto con las otras proteínas no deseadas en la corriente de carga (por ejemplo, proteína de la célula hospedadora o subproductos de proteína) y sale en el flujo continuo. Después de algún tiempo, la matriz se satura completamente con el compuesto diana y ya no se puede unir a todo el compuesto diana, y cualquier material de carga adicional permanece sin unir y pasa a través de la matriz.

20 La Figura 3 muestra la distribución de la concentración de proteína de interés (compuesto diana) cuando se sobrecarga la matriz cromatográfica de forma controlada. La matriz cromatográfica puede cargarse con material de carga que contiene el compuesto diana hasta el momento en que una parte significativa pase a través de la matriz sin unirse mientras que una cantidad adicional de los compuestos diana continúa unida. El alcance de esta sobrecarga no tiene por qué llegar al punto de saturación. Este material de sobrecarga que contiene el compuesto diana no unido puede dirigirse al recipiente de reciclaje, y la zona en la que se recolecta no necesita incluir toda la longitud y puede comenzar después de que el compuesto diana comience a filtrarse y terminar antes de que el compuesto diana emergente deje de filtrarse.

25 La Figura 4 muestra un diagrama del proceso de acuerdo con la invención. Una separación cromatográfica normal puede implicar una etapa de unión donde la proteína de interés (compuesto diana) se une a la matriz inmovilizada, y una etapa de elución donde el compuesto diana se elimina químicamente de la matriz. En el medio, normalmente hay etapas de lavado y acondicionamiento para eliminar impurezas adicionales y mantener la calidad de la matriz, durante las cuales estos materiales normalmente se dirigen a los desechos. En el nuevo proceso de acuerdo con la presente invención, se aplica una carga que contiene el compuesto diana hasta que se filtra. Una parte de esto se retiene en un recipiente de reciclaje. En un ciclo posterior del proceso de la invención, esto se vuelve a aplicar a la matriz antes de aplicar material de carga adicional que contiene el compuesto diana. De nuevo, esto se aplica hasta que la matriz está sobrecargada y el compuesto diana se filtra. Luego se dirige al recipiente de reciclaje. Este proceso se repite durante tantos ciclos como se desee, luego, en un ciclo final, se aplica una cantidad más pequeña de carga nueva y no se recolecta material reciclado.

30 La Figura 5 muestra un gráfico de cromatografía (cromatograma) de las mediciones de la corriente de flujo continuo que emerge de una columna cromatográfica, con volumen aplicado en el eje x, la intensidad UV medida en el eje izquierdo y la conductividad en el eje derecho. En este ejemplo, una columna empacada a una altura de lecho de 20 cm con matriz Capto S (GE Healthcare) se sobrecarga a 900 cm/h.

35 La Figura 6 muestra un modelo matemático de un experimento de avance real de un producto diana Fab cargado a un valor de 1,66 mg/ml en una columna Capto S de 20 cm de altura de lecho a 900 cm/h hasta la saturación completa, con el modelo optimizado para datos de absorbencia de avance normalizados a 290 nm con los valores de referencia restados.

40 La Figura 7 muestra un ejemplo real de una extensión de sobrecarga optimizada matemáticamente para el Fab diana en la columna Capto S a 900 cm/h, con ponderación computacional uniforme para productividad (producto/tiempo) y capacidad productiva (producto/tiempo/cantidad de matriz) en negro rayado. La zona de recogida correspondiente para el reciclaje se muestra como una línea gris, optimizada matemáticamente con una pérdida de producto permitida de hasta un 2 %.

45 La Figura 8 muestra una tabla de configuraciones de bloques operativos en volúmenes de columna para cada uno de los tres tipos de ciclo (ciclo inicial, ciclo de ejecución y ciclo final) que operan en la metodología propuesta.

50 La Figura 9 muestra un cromatograma de funcionamiento de un ciclo inicial en el proceso de acuerdo con la

invención, con absorbencia mostrada en el eje izquierdo, conductividad mostrada en el eje derecho y volumen mostrado en el eje x.

5 La Figura 10 muestra tres cromatogramas superpuestos de funcionamiento del 2º, 3º y 4º ciclo en el proceso de acuerdo con la invención, con absorbencia mostrada en el eje izquierdo, conductividad mostrada en el eje derecho y volumen mostrado en el eje x.

10 La Figura 11 muestra un cromatograma de funcionamiento de un quinto y último ciclo en el proceso de acuerdo con la invención, con absorbencia mostrada en el eje izquierdo, conductividad mostrada en el eje derecho y volumen mostrado en el eje x.

15 La Figura 12 muestra una tabla de resultados resumidos para hacer funcionar el proceso de acuerdo con la invención de un Fab a 900 cm/h en una columna Capto S de 20 cm. Los rendimientos se calculan basándose en el eluido liberado frente al producto cargado para ese ciclo. Dado que el ciclo de inicio se sobrecarga adicionalmente produciendo el reciclaje para el siguiente ciclo, su rendimiento se reduce artificialmente, y dado que el ciclo final está relativamente subcargado para evitar un reciclaje en exceso, su rendimiento es artificialmente alto ya que recibe reciclaje del ciclo anterior además de nueva carga aplicada que eluye todo junto, dando un rendimiento aparente superior al 100 %. El rendimiento total del proceso es marginalmente mayor que el 100 % que está dentro de la tolerancia de las mediciones e indica una recuperación esencialmente completa de la proteína cargada.

20 La Figura 13 muestra una tabla de resultados resumidos para hacer funcionar el proceso de acuerdo con la invención de un AcM a 500 cm/h en una columna MabSelect SuRE LX de 20 cm. Los rendimientos se calculan basándose en el eluido liberado frente al producto cargado. Dado que el ciclo de inicio se sobrecarga adicionalmente produciendo el reciclaje para el siguiente ciclo, su rendimiento se reduce artificialmente, y dado que el ciclo final está relativamente subcargado para evitar un reciclaje en exceso, su rendimiento es artificialmente alto ya que recibe reciclaje del ciclo anterior además de nueva carga aplicada que eluye todo junto, dando un rendimiento aparente superior al 100 %. La mejora general proporciona una medida precisa de la salida total frente a la entrada total.

25 La Figura 14 muestra una tabla de resultados resumidos para hacer funcionar el proceso de acuerdo con la invención de un AcM a 150 cm/h en una columna MabSelect SuRE LX de 10 cm. Los rendimientos se calculan basándose en el eluido liberado frente al producto cargado. Dado que el ciclo de inicio se sobrecarga adicionalmente produciendo el reciclaje para el siguiente ciclo, su rendimiento se reduce artificialmente, y dado que el ciclo final está relativamente subcargado para evitar un reciclaje en exceso, su rendimiento es artificialmente alto ya que recibe reciclaje del ciclo anterior además de nueva carga aplicada que eluye todo junto, dando un rendimiento aparente superior al 100 %. La mejora general proporciona una medida precisa de la salida total frente a la entrada total.

#### 40 Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado ahora un nuevo proceso para la purificación de una proteína de interés que implica un uso más eficaz y rentable de matrices cromatográficas mientras se mantiene o mejora el rendimiento y la pureza de la proteína purificada.

45 En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de

50 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que la proteína se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica;

55 b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

60 c) en un ciclo de cromatografía operativo adicional, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente a la misma matriz cromatográfica operada de manera que la proteína de interés se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica.

En una variación del primer aspecto la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de

65 d) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que la proteína se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a

80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica;

e) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

5 f) volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente a la misma matriz cromatográfica y cargar adicionalmente mezcla de carga nueva en un ciclo de cromatografía operativo adicional operado de manera que la proteína de interés se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica.

10 En otra variación del primer aspecto, la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de

15 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar un primer volumen de una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que la proteína se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica;

20 b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

c) en un ciclo de cromatografía operativo adicional, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente y cargar un segundo volumen de la proteína de interés del primer recipiente a la misma matriz cromatográfica operada de manera que la proteína de interés se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza un 40 a 100 %, 50 a 100 %, 60 a 100 %, 70 a 100 %, 80 a 100 %, 90 a 100 %, 70 a 90 % o 70 a 80 %, 60 a 90 %, 60 a 80 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica.

30 La recarga del flujo continuo desde el segundo recipiente a la misma matriz cromatográfica se puede realizar en el proceso de la invención después, junto con o preferentemente antes, antes de cargar el segundo volumen de la proteína de interés desde el primer recipiente.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de

35 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar un primer volumen de una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica;

b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y

40 c) en un ciclo de cromatografía operativo adicional, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente y cargar un segundo volumen de la proteína de interés desde el primer recipiente a la misma matriz cromatográfica operada de manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica.

45 En una realización adicional, la invención proporciona el proceso de acuerdo con el segundo aspecto, en donde en la etapa (a) la carga de la proteína de interés se detiene cuando se alcanza al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la capacidad máxima de unión estática.

50 En una segunda realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera o la segunda realización de los aspectos de la invención, en donde el ciclo de cromatografía operativo adicional es el ciclo de cromatografía inmediatamente siguiente.

55 En una tercera realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera y segunda realización de los aspectos de la invención, en donde la concentración de la proteína de interés en el flujo continuo se mide sobre línea, en línea o fuera de línea. La concentración de proteína de interés en el flujo continuo se puede medir en el proceso de acuerdo con la invención sobre línea, por ejemplo, con un detector conectado a la salida de la matriz cromatográfica midiendo en tiempo real, en línea, por ejemplo, con muestras tomadas de la salida de la matriz cromatográfica y medidas con un detector colocado cerca de la matriz, o fuera de línea, por ejemplo, con muestras tomadas de la salida de la matriz cromatográfica y medidas después de un retraso en un detector colocado distante, por ejemplo, en una habitación separada de la matriz.

60 La concentración de proteína o cualquier otra molécula de interés en el flujo continuo se puede medir en el proceso de acuerdo con cualquier realización de la invención mediante cualquier técnica conocida en la materia tal como, pero sin limitación, medir la absorbencia óptica o la fluorescencia.

65 La proteína de interés se puede determinar en el flujo continuo en el proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención mediante la observación de aumentos o disminuciones en el transcurso del tiempo de la

absorbencia ultravioleta o la señal de fluorescencia más allá del nivel de estado estable de la absorbencia ultravioleta o la señal de fluorescencia de fondo causada por otras impurezas proteicas en el flujo continuo.

5 La concentración de la proteína de interés en el flujo continuo se puede medir en el proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención mediante absorbencia ultravioleta o fluorescencia a cualquier longitud de onda adecuada como se conoce en la materia, por ejemplo, a 280 nm, y preferentemente usando una longitud de onda de excitación y/o emisión subóptima, tal como 290 nm, 300 nm o 310 nm, para permitir la detección de la proteína de interés en el flujo continuo de la matriz cromatográfica incluso cuando hay una señal en exceso de impurezas proteicas en el flujo continuo.

10 En una cuarta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda y tercera realización de los aspectos de la invención, en donde la recogida del flujo continuo se inicia en una primera concentración predeterminada de la proteína de interés en el flujo continuo y se detiene en una segunda concentración predeterminada de la proteína de interés en el flujo continuo. En realizaciones adicionales se inicia la recolección de proteína de interés en el flujo continuo, por ejemplo, a una concentración de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml o 0,2 mg/ml de proteína de interés en el flujo continuo y se detiene, por ejemplo, a una concentración de 0,6 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml o 5 mg/ml de proteína de interés en el flujo continuo.

15 En una quinta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera y cuarta realización de los aspectos de la invención, en donde una fracción predeterminada del flujo continuo, tal como, por ejemplo, un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % del flujo continuo, se recoge en el segundo recipiente.

20 En una sexta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta, realización de los aspectos de la invención, en donde el flujo continuo recogido en el segundo recipiente no se procesa antes o mientras se recarga en la matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo adicional.

25 En una séptima realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta realización de los aspectos de la invención, en donde el flujo continuo recogido en el segundo recipiente es, tras la finalización del ciclo de cromatografía, recargado directamente en la matriz cromatográfica en el siguiente ciclo de cromatografía operativo.

30 En una octava realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima realización de los aspectos de la invención, en donde el flujo continuo recogido en el segundo recipiente se procesa antes o mientras se vuelve a cargar en la matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo adicional. El procesamiento puede ser, por ejemplo, movimiento o agitación, dilución (por ejemplo, en agua o tampón), ajuste de concentración, (por ejemplo, utilizando un conjunto de filtro de vacío), ajuste de pH, ajuste de conductividad, intercambio de tampón o disolvente, enfriamiento o calentamiento o cualquier combinación de los mismos.

35 En una novena realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava realización de los aspectos de la invención, en donde el flujo continuo de múltiples ciclos de cromatografía operativos separados recogido en el segundo recipiente se agrupa y se vuelve a cargar en la misma matriz cromatográfica en otro ciclo. El flujo continuo de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ciclos de cromatografía operativos se puede recoger en un solo segundo recipiente o en un segundo, 40 tercer, cuarto o más recipientes y volverse a cargar en la matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo adicional.

45 En una décima realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realización de los aspectos de la invención, en donde el proceso comprende más de una etapa de cromatografía, y dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía funcionan de manera que el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida se recoge en un recipiente que no sea el recipiente del que se ha cargado la matriz cromatográfica, y el flujo continuo se vuelve a cargar desde dicho recipiente a la misma matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo posterior.

50 En una undécima realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena y décima realización de los aspectos de la invención, en donde el proceso comprende una, dos, tres, cuatro o más de cuatro etapas de cromatografía. Preferentemente, una, dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía se realizan en una columna cromatográfica.

55 En una duodécima realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la undécima realización de los aspectos de la invención, en donde las tres etapas de cromatografía son cromatografía de proteína A seguida de cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de intercambio aniónico. En una realización del proceso de la invención, el eluido de la cromatografía de proteína A se somete a cromatografía de intercambio catiónico operada en modo de unión y elución desde donde se recupera un eluido que contiene la proteína de interés, y dicho eluido se somete a cromatografía de intercambio aniónico para producir un flujo continuo que contenga la proteína de interés. El experto en la materia entenderá que el proceso de acuerdo con la invención puede comprender otras etapas

entre cada una de las tres etapas de cromatografía, tal como, por ejemplo, diafiltración.

- 5 En una decimotercera realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima y duodécima realización de los aspectos de la invención, en donde la cromatografía se selecciona de cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto, tal como cromatografía de hidroxapatita, cromatografía quiral o cromatografía dieléctrica.
- 10 En una decimocuarta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realización de los aspectos de la invención, en donde la matriz/matrices cromatográficas para una, dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía son columnas cromatográficas.
- 15 En una decimoquinta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera y decimocuarta realización de los aspectos de la invención, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 20 En una decimosexta realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta y decimoquinta realización de los aspectos de la invención, en donde la mezcla comprende la proteína de interés y contaminantes de la célula hospedadora procarionta, por ejemplo, bacteriana, tal como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de la célula hospedadora.
- 25 En una decimoséptima realización, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta y decimosexta realización de los aspectos de la invención, en donde la mezcla comprende la proteína de interés y contaminantes de la célula hospedadora eucariota, por ejemplo, de mamífero, tal como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de la célula hospedadora.
- 30 En una decimoctava realización, la invención proporciona un método de fabricación de una proteína de interés que comprende el proceso de purificación de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta y decimoséptima realización de los aspectos de la invención.
- 35 En una decimonovena realización de los aspectos la invención proporciona una proteína, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, obtenido mediante el método de la decimosexta realización.
- 40 En realizaciones adicionales de los aspectos de la invención, al menos una de las columnas cromatográficas en el proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones tiene un volumen de lecho de más de 1 l, más de 20 l, más de 30 l, más de 50 l, más de 75 l, más de 100 l o más de 200 l, preferentemente entre 20 l y 200 l, 30 l y 100 l o 50 l y 100 l.
- 45 En otras realizaciones de los aspectos, la invención proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en donde una, dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía se operan en un adsorbente de membrana o monolítico.
- 50 En otras realizaciones de los aspectos, la invención proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en donde una, dos, tres, cuatro o todas las etapas de cromatografía se operan en una sola columna cromatográfica, adsorbente de membrana o adsorbente monolítico.
- 55 En una realización adicional de los aspectos la invención proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en donde el flujo continuo recogido se vuelve a cargar desde el segundo recipiente en la matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo posterior antes de cargar un nuevo lote de la mezcla del primer recipiente que contiene la proteína de interés en dicha matriz cromatográfica. La recarga del flujo continuo en un ciclo de cromatografía posterior antes de que la mezcla del primer recipiente que contiene la proteína de interés permita la unión completa de la proteína de interés reciclada mediante la columna vacía garantiza que se capture en solo dos ciclos.
- 60 En otra realización de los aspectos, la invención proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en donde el flujo continuo recogido se vuelve a cargar desde el segundo recipiente en la matriz cromatográfica en un ciclo de cromatografía operativo posterior después o junto con un nuevo lote de la mezcla del primer recipiente que contiene la proteína de interés, se carga en dicha matriz de cromatografía.
- 65 En otras realizaciones de los aspectos, la invención proporciona un proceso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones, en donde el flujo continuo recolectado en el segundo recipiente se almacena durante al menos 30

minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 24 horas, un día, dos días, 7 días, 14 días, un mes, 2 meses, 6 meses o un año.

La expresión "cromatografía de intercambio aniónico", como se usa en el presente documento, se refiere a una cromatografía en donde la fase sólida está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como los grupos amino cuaternarios, unidos a la misma. Las matrices de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™, FAST Q SEPHAROSE™ Capto Q y Capto Q Impres (GE Healthcare), Unosphere y Nuvia Q (BioRad), GigaCap Q (Tosoh), Mustang Q XT (Palo), Fractogel Q y Eshmuno Q (Merck Millipore) y los adsorbentes de membrana de intercambio aniónico tales como SartoBind Q (Sartorius) y adsorbentes monolíticos tales como QA monoliths (Bia Separations).

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos de longitud completa tetraméricos monoclonales o policlonales que comprenden dos cadenas pesadas y dos ligeras. Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras pueden ser idénticas o diferentes, por ejemplo, en anticuerpos biespecíficos tales como Biclonics® o DuoBody®. El término inmunoglobulina o inmunoglobulinas se usa como sinónimo de "anticuerpo" o "anticuerpos", respectivamente. El término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, anticuerpos recombinantes que se generan mediante tecnologías recombinantes como se conoce en la materia. Un "anticuerpo" o "anticuerpos" pueden ser de cualquier origen, incluyendo de especies de mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, primates tales como de chimpancé, babuino, macaco de la India o macaco cangrejero), roedor (por ejemplo, de ratón, rata, conejo o conejillo de indias), cabra, especie bovina o equina. El anticuerpo en el presente documento está dirigido contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos. Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento o una citocina. Las dianas moleculares preferidas para los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen polipéptidos CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD40 y CD40-L; FcRN; OX40; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3, incluyendo sus subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); quimiocinas y citocinas o sus receptores, tales como IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ , IL-2, IL-6, el receptor de IL-6, IL-12, IL-13, IL-17A y/o IL-17F, IL-18, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ ; factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de mpl; CTLA-4; polipéptido C; PD1, PD-L1, PCSK9; esclerostina; etc.

La expresión "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de un anticuerpo, generalmente la región variable o de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen cualquier anticuerpo que carece de o no tiene la porción Fc. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo también incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv y scFv; así como diacuerpos, incluyendo formatos tales como BiTEs® (Activadores de linfocitos T biespecíficos) y DARTs™ (tecnología de reorientación de afinidad dual), triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio (dAbs, por sus siglas en inglés), tales como sdAbs, fragmentos VHH y VNAR, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos o multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos o anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, construcciones Fab-Fv, Fab-scFv, Fab(Fv)<sub>2</sub> o Fab-(scFv)<sub>2</sub>. Los fragmentos y derivados de anticuerpos como se definieron anteriormente son conocidos en la materia (Kontermann 2012). Para mayor claridad, debe entenderse que Fab-Fv se refiere a una construcción que contiene una región Fv y una región Fab unidas en cualquier orden, es decir, Fab-Fv o Fv-Fab, en donde los últimos aminoácidos en una región están seguidos por los primeros aminoácidos en la siguiente región o viceversa. De manera similar, debe entenderse que Fab-scFv se refiere a una construcción que contiene una región scFv y una región Fab unidas en cualquier orden y, en el caso del Fab, a cualquier cadena polipeptídica, es decir, Fab-scFv o scFv-Fab, en donde el último aminoácido en una región es seguido por el primer aminoácido en la siguiente región o viceversa. De la misma manera, Fab-(Fv)<sub>2</sub> debe entenderse que se refiere a una construcción que contiene dos regiones Fv y una región Fab unidas en cualquier orden, es decir, Fab-Fv-Fv, Fv-Fab-Fv o Fv-Fv-Fab, en donde los últimos aminoácidos en una región están seguidos por los primeros aminoácidos en la siguiente región o viceversa. De manera similar, Fab-(scFv)<sub>2</sub> debe entenderse que se refiere a una construcción que contiene dos regiones scFv y una región Fab unidas en cualquier orden y en el caso del Fab a cualquier cadena polipeptídica, lo que da como resultado 20 posibles permutaciones. Normalmente, estas construcciones incluyen un enlazador peptídico entre la primera región (por ejemplo, Fab) y la segunda región (por ejemplo, Fv). Dichos enlazadores son bien conocidos en la materia y pueden ser uno o más aminoácidos, normalmente optimizados en longitud y composición mediante un experto en la materia. Alternativamente, dichas regiones pueden estar unidas directamente, es decir, sin un enlazador peptídico. En el documento WO 2013/068571 se describen ejemplos de regiones enlazadoras adecuadas para unir un dominio variable a un Fab o Fab', e incluyen, pero sin limitación, secuencias enlazadoras flexibles y secuencias enlazadoras rígidas. Los fragmentos de anticuerpos pueden estar aglucosilados o glucosilados. La expresión "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo" también se refiere a derivados de anticuerpo que comprenden al menos un dominio de anticuerpo de unión a antígeno o de unión a receptor fc que está unido covalentemente a otro dominio de anticuerpo, a una proteína diferente o a una molécula no proteica.

La expresión "cromatografía de intercambio catiónico", como se usa en el presente documento, se refiere a una cromatografía en donde la fase sólida que está cargada negativamente, por ejemplo, tiene uno o más ligandos cargados negativamente, tal como, por ejemplo, un grupo carboxilato o sulfonato. Las matrices de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa y sulfonilo inmovilizado en agarosa tal como Capto S, Capto Adhere y Capto S Impres (GE Healthcare), Unosphere S y Nuvia S (BioRad), GigaCap S (Tosoh), Fractogel S y Eshmuno S (Merck Millipore) o adsorbentes de membrana de intercambio catiónico tal como SartoBind S (Sartorius) y adsorbentes de monolitos tal como monolitos de SO<sub>3</sub> (Bia Separations).

La expresión "columna cromatográfica " o "columna" en relación con la cromatografía, como se usa en el presente documento, se refiere a un recipiente, frecuentemente en forma de cilindro o pilar hueco que se rellena con la matriz cromatográfica. La matriz cromatográfica es el material que aporta las propiedades físicas y/o químicas que se emplean para la purificación.

La expresión "ciclo de cromatografía" o "ciclo de cromatografía operativo", como se usa en el presente documento, se refiere al funcionamiento de un solo ciclo de la secuencia de etapas del proceso en una asignación dada de la matriz cromatográfica que puede incluir, pero sin limitación, uno o más en una combinación secuencial de las siguientes etapas: una etapa de equilibrio, una etapa de recarga, una etapa de carga, una etapa de sobrecarga, una etapa de lavado posterior a la carga, una etapa de lavado secundario, una etapa de elución, una etapa de regeneración, una etapa de limpieza, una etapa de almacenamiento y cualquier período de pausa o espera. Por lo tanto, un ciclo adicional puede incluir una repetición de la misma secuencia de etapas de procesamiento.

La expresión "capacidad de unión dinámica" en relación con la cromatografía, como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de proteína de interés u otro compuesto diana que puede unirse a una matriz cromatográfica en un flujo constante sin tener una cantidad significativa de proteína de interés u otro compuesto diana en el flujo continuo. La capacidad de unión dinámica de una matriz cromatográfica se determina cargando una muestra que contiene una concentración conocida de proteína de interés. La carga de la muestra de proteína en la columna se controla y se unirá a la matriz hasta un determinado punto de ruptura antes de que la proteína no unida fluya a través de la matriz. A partir de la curva de ruptura con una pérdida de, por ejemplo, un 10 % de proteína, se encuentra la capacidad de unión dinámica y se detiene el experimento. A menudo, la capacidad de unión dinámica se define como la cantidad de proteína de interés que se puede unir a la matriz en un flujo constante con no más de un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12 %, 15 %, 17 % o 20 % de la proteína de interés perdida en el flujo continuo, preferentemente de la concentración de proteína de interés cargada en el mismo momento.

La expresión "flujo continuo", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición líquida que se obtiene dejando pasar una mezcla a través o sobre una matriz cromatográfica.

La expresión "cromatografía de interacción hidrófoba", como se usa en el presente documento, se refiere a una cromatografía en donde la fase sólida es hidrófoba, por ejemplo, tiene uno o más ligandos hidrófobos, tal como, por ejemplo, un grupo fenilo o butilo. Las matrices de interacción hidrófoba comercialmente disponibles incluyen fenilo o butilo inmovilizados en agarosa, tales como Capto Phenyl o Capto Butyl (GE Healthcare), ToyoPearl HIC (Tosoh) y Fractogel EMD Phenyl (Merck Millipore), o inmovilizado en un adsorbente de membrana tal como SartoBind HIC (Sartorius)

La expresión "adsorbente de membrana" o "cromatografía de membrana" en relación con la cromatografía, como se usa en el presente documento, se refiere a un formato de cromatografía, en donde una membrana semipermeable se aloja en un recipiente a través del cual se suministra una corriente de alimentación, y cuyas superficies se fijan con resina o ligandos que son los materiales que proporcionan las propiedades físicas y/o químicas que se emplean para la purificación.

La expresión "cromatografía de monolitos" o "adsorbentes de monolitos" en relación con la cromatografía, como se usa en el presente documento, se refiere a un formato de cromatografía, en donde un volumen continuo de un polímero poroso se aloja en un recipiente a través del cual se suministra una corriente de alimentación, y cuyas superficies se fijan con resina o ligandos que son materiales que proporcionan las propiedades físicas y/o químicas que se emplean para la purificación.

La expresión cromatografía de "modo mixto", como se usa en el presente documento, se refiere a una cromatografía en donde la fase sólida puede tener una mezcla de diferentes ligandos cargados o no cargados, tal como, por ejemplo, hidroxiapatita. Las matrices más mixtas disponibles comercialmente incluyen Ceramic Hydroxiapatita (BioRad) o Capto Adhere (GE Healthcare) y HA Ultrogel Hydroxyapatite (Pall).

El término "mezcla", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición al menos parcialmente líquida que comprende al menos una proteína de interés que se busca purificar a partir de otras sustancias, tales como proteínas de células hospedadoras, ADN u otros componentes de células hospedadoras, que también pueden estar presente. Las mezclas pueden, por ejemplo, ser suspensiones, soluciones acuosas, sistemas de disolventes orgánicos

o mezclas o soluciones de disolventes acuosos/orgánicos. Las mezclas son a menudo mezclas o soluciones complejas que comprenden muchas moléculas biológicas (tales como proteínas, anticuerpos, hormonas, polinucleótidos y virus), moléculas pequeñas (tales como sales, azúcares, lípidos, etc.) e incluso material particulado. Si bien una mezcla normal de origen biológico puede comenzar como una solución o suspensión acuosa, también puede contener

5 disolventes orgánicos utilizados en etapas de separación anteriores, tales como precipitaciones, extracciones y similares de disolventes.

La expresión "capacidad de unión estática" en relación con la cromatografía, como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad máxima de una proteína de interés u otro compuesto diana que se puede unir a una matriz

10 cromatográfica en condiciones estáticas sin tener una cantidad significativa de proteína de interés u otro compuesto diana en el flujo continuo. La capacidad de unión estática se mide normalmente en modo discontinuo en un vaso de precipitados y normalmente se denomina la cantidad máxima de proteína unida a un medio de cromatografía en determinadas condiciones de concentración de proteína y disolvente.

15 La proteína de interés, tal como anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se puede purificar de acuerdo con el proceso de la presente invención se puede producir mediante el cultivo de células hospedadoras transformadas con uno o más vectores de expresión que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo recombinante.

Las células hospedadoras de acuerdo con las realizaciones de la invención son, por ejemplo, procariotas, levadura

20 (por ejemplo, sin limitación, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* y otra *Kluyveromyces spp.*, *Yarrowia lipolytica*), *Mixomiceto* (por ejemplo, sin limitación, *Dictyostelium discoideum*), hongos filamentosos (por ejemplo, sin limitación, *Trichoderma reesei* y otra *Trichoderma spp.*, *Aspergillus niger* y otra *Aspergillus spp.*), musgo (por ejemplo, sin limitación, *Physcomitrella patens*, *Atrichum undulatum*), células de insectos o mamíferos. Las células hospedadoras

25 de mamíferos son, por ejemplo, sin limitación, NSO, SP2.0, células 3T3, células COS, células de osteosarcoma humano, linfocitos MRC-5, células de riñón de cría de hámster (BHK, por sus siglas en inglés), células VERO, células CHO, células rCHO-tPA, células de antígeno de superficie rCHO-Hep B, células CHO-S, células HEK 293, células rHEK 293, células C127, células de antígeno de superficie rC127-Hep B, células de fibroblastos humanos, células de estroma, células de hepatocitos o células PER.C6.

Las células hospedadoras son preferentemente células hospedadoras eucariotas, preferentemente células

30 hospedadoras de mamífero, más preferentemente células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), por ejemplo, de la cepa DG44.

Para células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, levaduras, células de insectos o mamíferos), se pueden emplear

35 diferentes secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, dependiendo de la naturaleza del hospedador. Pueden proceder de fuentes víricas, tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio, o similar, en donde las señales reguladoras están asociadas con un gen en particular que tiene un alto nivel de expresión. Algunos ejemplos son el promotor TK del virus del herpes, el promotor temprano de SV40, el promotor del gen gal4 de levadura, etc. Pueden seleccionarse señales reguladoras de iniciación transcripcional que permitan la represión y activación, de

40 modo que se pueda modular la expresión de los genes. Las células, que se han transformado de forma estable por el ADN introducido, se pueden seleccionar mediante la introducción también de uno o más marcadores, que permiten la selección de células hospedadoras, que contienen el vector de expresión. El marcador también puede proporcionar

45 fototrofia a un hospedador auxotrópico, resistencia a biocidas, por ejemplo, sin limitación, antibióticos o metales pesados, tales como cobre, o similares. El gen marcador seleccionable se puede unir directamente a las secuencias de ADN del gen a expresar o introducirse en la misma célula mediante transfección conjunta. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de proteínas de la invención.

Las células hospedadoras eucariotas se transfectan con uno o más vectores de expresión que codifican la proteína

50 de interés y posteriormente se cultivan en cualquier medio que apoye su crecimiento y expresión de la proteína de interés. El medio es un medio químicamente definido que está libre de productos procedentes de animales tales como suero animal y peptona. Existen diferentes medios de cultivo celular a disposición del experto en la materia que comprenden diferentes combinaciones de vitaminas, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, iones, tampones, nucleósidos, glucosa o una fuente de energía equivalente, presentes en concentraciones apropiadas para

55 permitir el crecimiento celular y la producción de proteínas. Pueden incluirse componentes adicionales del medio de cultivo celular en el medio de cultivo celular a concentraciones apropiadas en diferentes momentos durante un ciclo de cultivo celular que sería conocido por los expertos en la materia.

El cultivo de células de mamíferos puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado, tal como un matraz de agitación

60 o un biorreactor, que puede o no funcionar en modo semicontinuo dependiendo de la escala de producción requerida. Estos biorreactores pueden ser reactores de depósito de agitación o de aire. Se encuentran disponibles varios biorreactores a gran escala con una capacidad de más de 1.000 l a 50.000 l o 100.000 l, preferentemente entre 5.000 l y 20.000 l, o hasta 10.000 l. Alternativamente, también se pueden usar biorreactores de una escala más pequeña, tal como entre 2 l y 100 l, para fabricar un anticuerpo de acuerdo con el método de la invención.

Una proteína de interés, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se produce en una célula

65

hospedadora eucariota, tal como una célula CHO, de acuerdo con el proceso y métodos de la presente invención, se encuentra normalmente en el sobrenadante del cultivo celular. En una realización de la invención, dicho sobrenadante es la mezcla purificada en el proceso de la invención.

5 Por lo tanto, en una realización particular de la invención, el proceso y métodos de la invención comprenden una etapa de centrifugación del sobrenadante y recuperación de la fase líquida después de la centrifugación para obtener la mezcla que contiene la proteína de interés para una purificación adicional de acuerdo con el proceso de la invención.

10 Alternativamente, dicho sobrenadante puede recuperarse usando técnicas de clarificación conocidas por los expertos tal como, por ejemplo, filtración en profundidad. Por lo tanto, en una realización particular de la invención, el método comprende una etapa de filtración en profundidad con el fin de obtener la mezcla que contiene la proteína de interés para una purificación adicional de acuerdo con el proceso de la invención.

15 Como alternativa, las células hospedadoras son células procariotas, preferentemente bacterias gramnegativas, preferentemente, células de *E. coli*. Las células hospedadoras procariotas para la expresión de proteínas son bien conocidas en la materia. Las células hospedadoras son células recombinantes que se han modificado genéticamente para producir la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo. Las células hospedadoras recombinantes de *E. coli* pueden proceder de cualquier cepa de *E. coli* adecuada incluyendo MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 $\alpha$ , DH1, BL21, K12, XL1Blue y JM109. Un ejemplo es la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325)  
 20 una cepa hospedadora comúnmente utilizada para fermentaciones de proteínas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden producir mediante el cultivo de cepas de *E. coli* modificadas, por ejemplo, cepas mutantes metabólicas o deficientes en proteasa de *E. coli*.

25 Un fragmento de anticuerpo que se puede purificar de acuerdo con los métodos de la presente invención se encuentra normalmente en el periplasma de la célula hospedadora de *E. coli* o en el sobrenadante del cultivo de la célula hospedadora, dependiendo de la naturaleza de la proteína, la escala de producción y la cepa de *E. coli* utilizada. Los métodos para dirigir proteínas a estos compartimentos son bien conocidos en la materia. Ejemplos de secuencias señal adecuadas para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen las secuencias señal PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*. Las proteínas pueden dirigirse al sobrenadante basándose en las rutas de secreción natural  
 30 o mediante la inducción de una fuga limitada de la membrana externa para provocar la secreción de proteínas, ejemplos de los cuales son el uso del líder pelB, el líder de la proteína A, la expresión conjunta de la proteína de liberación de bacteriocina, la proteína de liberación de bacteriocina inducida por mitomicina junto con la adición de glicina al medio de cultivo y la expresión conjunta del gen kil para la permeabilización de la membrana. Mucho más preferentemente, en los métodos de la invención, la proteína recombinante se expresa en el periplasma del  
 35 hospedador *E. coli*.

La expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras de *E. coli* también puede estar bajo el control de un sistema inducible, donde la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* está bajo el control de un promotor inducible. Muchos promotores inducibles adecuados para usar en *E. coli* son bien conocidos en la materia y dependen  
 40 del promotor; la expresión de la proteína recombinante se puede inducir mediante factores variables tales como la temperatura o la concentración de una sustancia particular en el medio de crecimiento. Ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores lac, tac y trc de *E. coli* que son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los promotores phoA, trp y araBAD que son inducidos por fosfato, triptófano y L-arabinosa respectivamente. La expresión se puede inducir mediante, por ejemplo, la adición de  
 45 un inductor o un cambio de temperatura donde la inducción depende de la temperatura. Cuando la inducción de la expresión de la proteína recombinante se logra mediante la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede añadirse mediante cualquier método adecuado dependiendo del sistema de fermentación y del inductor, por ejemplo, mediante adiciones de una o varias tomas o mediante una adición gradual del inductor a través de una alimentación. Se apreciará que puede haber un retraso entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión de la proteína,  
 50 por ejemplo, cuando el inductor es lactosa puede haber un retraso antes de que se produzca la inducción de la expresión de la proteína mientras se utiliza cualquier fuente de carbono preexistente antes de la lactosa.

Los cultivos de células hospedadoras de *E. coli* (fermentaciones) pueden cultivarse en cualquier medio que apoye el crecimiento de *E. coli* y la expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente  
 55 definido tal como, por ejemplo, el descrito aquí.

El cultivo de las células hospedadoras de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado, tal como un matraz de agitación o un fermentador, dependiendo de la escala de producción requerida. Se encuentran disponibles  
 60 varios fermentadores a gran escala con una capacidad de más de 1.000 l hasta 100.000 l. Preferentemente, se utilizan fermentadores de entre 1.000 l y 50.000 l, más preferentemente de entre 1.000 l y 10.000 l o 12.000 l. También se pueden utilizar fermentadores de menor escala con una capacidad de entre 0,5 l y 1.000 l.

La fermentación de células hospedadoras tales como, CHO o *E. coli*, puede realizarse en cualquier sistema adecuado, por ejemplo, en modo continuo, discontinuo o semicontinuo dependiendo de la proteína y los rendimientos requeridos.  
 65 El modo discontinuo se puede usar con adiciones de nutrientes o inductores cuando sea necesario. Como alternativa, se puede usar un cultivo semicontinuo y los cultivos se pueden cultivar en modo de preinducción discontinua a la tasa

de crecimiento específica máxima que se puede mantener utilizando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentación de nutrientes utilizados para controlar la tasa de crecimiento hasta que la fermentación se completa.

- 5 En una realización, el proceso de acuerdo con la presente invención comprende antes de la carga en la primera matriz cromatográfica una etapa de captura y una etapa de centrifugación de la cosecha del cultivo celular, seguido de la suspensión de las células hospedadoras mediante la adición del tampón de extracción.

10 Para los procesos de fermentación de *E. coli* en donde la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo, se encuentra en el espacio periplásmico de la célula hospedadora, se requiere para liberar la proteína de la célula hospedadora. La liberación se puede lograr mediante cualquier método adecuado, tal como la lisis celular mediante tratamiento mecánico o de presión, tratamiento de congelación-descongelación, choque osmótico, agentes de extracción o tratamiento térmico. Dichos métodos de extracción para la liberación de proteínas son bien conocidos en la materia.

15 En una realización particular del método de la invención, la mezcla en el proceso de la invención de acuerdo con cualquier realización se genera mediante elución del anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a la Proteína A, por ejemplo, con un tampón de elución con un pH adecuado para interrumpir la unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo. Dicho pH depende de la molécula específica y, en general, el experto en la materia lo determina empíricamente y ajusta para lograr el criterio de valoración deseado.

20 Hay muchos materiales de cromatografía disponibles para el experto en la materia que contienen dicha proteína A recombinante nativa, tal como, por ejemplo, MabSelect® (GE Healthcare), Absolute® (Novasep), Captiv A® (Repligen) o Amsphere® (JSR).

25 Los tampones adecuados para usar como tampones de lavado y elución en cromatografía de proteína A están fácilmente disponibles en la materia y pueden elegirse a modo de ejemplos no limitantes de entre solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), tampones Tris, de histidina, acetato, citrato, o tampones MES (imidazol de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), BES (ácido N,N-(bis-2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico) o HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico).

30 Como se usa en el presente documento, "un" o "una" puede significar uno o más. El uso del término "o" en el presente documento significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere sólo a alternativas e "y/o". Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Como se usa en el presente documento, "entre X e Y" puede significar un intervalo que incluye X e Y.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1

Se realizó un experimento de sobrecarga de columna para establecer parámetros de rendimiento de sobrecarga para el funcionamiento discontinuo posterior. Se unieron columnas de intercambio iónico rellenas previamente 2X GE HiScreen CaptoS de 4,67 ml y 10 cm (código de producto de GE Healthcare Life Sciences: 28-9269-79) de extremo a extremo para dar una columna de intercambio catiónico de 9,313 ml y de 20 cm de altura de lecho. Estas se unieron mediante un tubo capilar a una máquina de purificación GE Akta Avant (código de producto 28930842). Se colocaron tampones y se cebaron en las líneas de entrada. Las columnas previamente se separaron y se limpiaron de cualquier material unido usando dos volúmenes de columna (VC) de un tampón de alta conductividad compuesto de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1 M a pH 4,5 y una conductividad de 85 mS/cm seguido de un tampón cáustico compuesto por dos VC de hidróxido de sodio 0,5 M bombeados a 900 cm/h en una dirección de flujo descendente y se incubaron sin flujo a 20 °C durante 15 minutos antes de lavarlas para equilibrar la matriz de la columna usando 3 VC de tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,5 y una conductividad de 4,0 mS/cm en flujo descendente. Se conectaron y calibraron un monitor de conductividad en línea y tres detectores de absorbencia para observar el flujo continuo. Los detectores de absorbencia se establecieron en 280 nm, 290 nm y 305 nm, cada uno con una longitud de recorrido de 2 mm. Se preparó extracto celular de *E. coli* que contenía un fragmento de anticuerpo (Fab) sobreexpresado de interés junto con las impurezas de la célula hospedadora, y se diluyó con agua de manera que el valor del Fab fuera 1,66 mg/ml con una conductividad de 10 mS/cm y un pH de 4,5. Esto se cargó en la columna a 900 cm/h para un total de 400 ml en flujo descendente para una aplicación total de 71,3 mg por ml de matriz cromatográfica, saturando completamente y excediendo la capacidad de unión estática o máxima de los ligandos cargados de la matriz para el Fab de interés a esa concentración. A continuación, se aplicaron tres VC más de tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,5 y una conductividad de 4,0 mS/cm a la columna para lavar los componentes débilmente unidos. Se aplicaron cinco VC de tampón con acetato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 225 mM a pH 4,5 y una conductividad de 15 mS/cm para desplazar los componentes diana fuertemente unidos que se recogieron en un recipiente a medida que emergían de la columna; este material recogido constituía el eluido purificado. Luego se aplicó secuencialmente una repetición de las etapas de separación y limpieza en la preparación para su uso posterior (*Figura*

5).

Los detectores de UV se utilizaron para controlar y registrar la cantidad relativa de impureza y producto que emerge de la columna durante la fase de carga y se introdujo la cantidad registrada de carga aplicada frente al nivel de señal emergente medido por la absorbencia del efluente a 290 nm para el ajuste de un modelo computacional a los datos para calcular el punto medio de capacidad del avance del producto y la cinética relacionada del proceso de unión (Figura 6). Este modelo se basó en un ajuste sigmoideal del avance de la proteína de interés emergente en el flujo continuo hasta la cantidad cargada unida a una desintegración exponencial modelando la proteína de interés no unida restante que emerge en el flujo continuo después de que se detuvo la aplicación de carga nueva, con parámetros adicionales para tener en cuenta la señal de impureza de la proteína de fondo.

En las condiciones descritas anteriormente para la matriz CaptoS funcionó en la corriente de alimentación con un Fab de interés con un valor de 1,66 mg/ml aplicado a 900 cm/h. La capacidad de unión dinámica calculada fue de 20,03 mg/ml de matriz por ciclo a una carga del 90 % del nivel de ruptura del 10 % y se calculó que la productividad era 23,52 mg/ml de matriz/hora. Se determinó que la capacidad de unión estática era de 32,8 mg/ml, que corresponde a un 161 % de la capacidad de unión dinámica. Esto se utilizó para predecir la capacidad y la productividad alcanzables del proceso general sobrecargado en la metodología semicontinua propuesta con una parte de la sobrecarga emergente recogida en un recipiente separado y recargada en la matriz cromatográfica en un ciclo posterior del proceso. Este modelo se repitió computacionalmente cambiando el alcance de la sobrecarga y los puntos de inicio y finalización de la sobrecarga recogida para alcanzar el equilibrio deseado de capacidad y productividad optimizadas, con un límite de pérdida de producto permisible definido por el usuario establecido en un máximo de un 2 %, y se pronosticó que funcionaría con una capacidad real de 31,40 mg/ml de matriz por ciclo y con una productividad de 25,65 mg/ml de matriz/hora, lo que representa una mejora de un 9,1 % en la productividad y una mejora de un 56,8 % en la capacidad por ciclo (Figura 7).

La operación de purificación se repitió usando estos ajustes previstos, con la columna separada, limpia y equilibrada de la misma manera. Luego se cargó la columna con 23,56 VC del mismo lote de carga proyectado mediante el modelo computacional y controlado mediante medición continua del volumen cargado, y con el efluente de sobrecarga recolectado después de 15,44 VC de carga se aplicó y recolectó en un recipiente (el segundo recipiente) para los siguientes 9,45 VC que se extienden más allá de la fase de carga y 1,33 VC en la etapa de lavado posterior. Luego se aplicó el mismo lavado que en el experimento anterior y fue seguido por el mismo proceso de elución, esta vez con el eluido emergente recogido en un tercer recipiente. Este proceso constituyó el primer ciclo con la porción de sobrecarga recolectada en el segundo recipiente retenida para usar posteriormente y la porción de eluido en el tercer recipiente constituyendo el producto purificado que se analizó para volumen, concentración y pureza (Figura 9). Para el segundo ciclo de cromatografía y el tercer y cuarto ciclos de cromatografía posteriores, las etapas de regeneración, limpieza en el lugar y equilibrado se repitieron al principio como antes, y luego se aplicó todo el contenido de los (segundos) recipientes de reciclaje recolectados por un total de 9,45 VC, seguido de 19,39 VC de un lote adicional de extracto de *E. coli*. Para cada uno de estos, nuevamente se recogieron 9,45 VC de sobrecarga en el segundo recipiente original, extendiendo 1,33 VC en la misma etapa de lavado subsiguiente, y fue seguido por el mismo proceso de elución para cada ciclo con los eluidos nuevamente probados para su rendimiento. Estos ciclos de cromatografía constituyeron ciclos de cromatografía en ejecución normales en el proceso propuesto. (Figura 10). Para un quinto ciclo de cromatografía, la separación, limpieza, equilibrio y recarga de la sobrecarga recogida se repitieron como antes, pero el extracto nuevo de *E. coli* solo se aplicó hasta el punto de la capacidad de unión dinámica operativa tradicional al 90 % de la capacidad de carga, ya que da un avance del 10 %, equivalente a 7,89 VC de carga adicional. Las siguientes etapas de lavado y elución se realizaron luego en su totalidad. Esto constituyó el ciclo de cromatografía final sin un funcionamiento de sobrecarga previsto y sin ciclos posteriores. (Figura 11). La configuración se puede ver en la (Figura 8). La capacidad real alcanzada en la matriz durante un ciclo de cromatografía en este experimento fue de 32,2 mg/ml que corresponde a un 98,2 % de la capacidad máxima de unión estática de la matriz. A modo de comparación, el proceso también funcionó con condiciones idénticas en una metodología discontinua tradicional pero sin las etapas de sobrecarga y reciclaje, y con la fase de carga solo aplicada a una capacidad de 20,03 mg/ml de la matriz cromatográfica que equivalía al 90 % de la capacidad de carga del nivel de avance del 10 % consistente con un funcionamiento tradicional comparable. Los resultados y la comparación con el funcionamiento tradicional se muestran en la Figura 12.

## Ejemplo 2

Metodología:

En un ejemplo paralelo del método, se unieron columnas cromatográficas de proteína A rellenas previamente 2X GE HiScreen MAb Select SuRE LX de 4,67 ml y de 10 cm (código de producto de GE Healthcare Life Sciences: 17-5474-05) de extremo a extremo para dar una columna de afinidad de Proteína A de 9,313 ml y de 20 cm de altura de lecho. Estas se conectaron mediante un tubo capilar a una máquina de purificación GE Akta PURE (código de producto 29-0182-24). De manera similar al ejemplo anterior, se colocaron tampones y se cebaron en las líneas de entrada. Las columnas fueron de manera similar previamente separadas y limpiadas de cualquier material unido utilizando dos volúmenes de columna (VC) de un tampón de ácido cítrico con un pH de 2,1 y dos VC de un tampón cáustico de hidróxido de sodio 0,1 M bombeados a 500 cm/h en una dirección de flujo descendente y se incubaron sin flujo a 20

°C durante 15 minutos. Se utilizaron cuatro VC de tampón de equilibrio con una composición de fosfato de sodio 50 mM a un pH de 7,0 y una conductividad de 6,0 mS/cm antes de aplicar la carga en todos los ciclos de cromatografía, se usaron otros tres VC del mismo tampón después de aplicar cargas para lavar los compuestos unidos de manera débil y se usaron cinco VC de acetato de sodio 30 mM a un pH de 3,7 para eluir el producto unido en todos los ciclos.

5 Se aplicaron los mismos monitores según la metodología anterior. La carga contenía un anticuerpo monoclonal expresado extracelularmente a un valor de 2,9 mg/ml de una célula hospedadora de mamífero que se filtró en profundidad para eliminar células enteras y fragmentos grandes, y el filtrado se aplicó a la columna en flujo descendente hasta 90 mg de anticuerpo diana/ml de matriz, por encima de la capacidad de unión estática normal de la matriz. Las mediciones del flujo continuo emergente se utilizaron de manera similar para modelar el proceso de avance y definir parámetros optimizados para la sobrecarga y el reciclaje de acuerdo con la metodología propuesta.

10 Estos ajustes se utilizaron luego para operar el proceso de purificación con un ciclo inicial sobrecargado, tres ciclos de cromatografía posteriores sobrecargados y reciclados, y un ciclo de cromatografía final con poca carga. Esto se comparó con una metodología discontinua tradicional equivalente en condiciones idénticas, pero sin las etapas de sobrecarga y reciclaje, y con la fase de carga solo aplicada a una capacidad de 29,68 mg/ml de la matriz cromatográfica que equivalía al 90 % de la capacidad de carga del nivel de avance del 10 % consistente con un funcionamiento tradicional comparable. Los resultados y la comparación con el funcionamiento tradicional se muestran en la *Figura 13*.

### 20 Ejemplo 3

Metodología:

En un ejemplo a gran escala del método, se empaquetaron 190 ml de resina de cromatografía de proteína A MAb Select SuRE LX 190 (código de producto de GE Healthcare Life Sciences: 17-5474-04) a una altura de 10 cm en una columna AxiChrom (código de producto de GE Healthcare Life Sciences: 28901831) y se unió mediante un tubo a una máquina de purificación piloto AKTA (código de producto de GE Healthcare Life Sciences 29-0086-12). Los recipientes con tampones se unieron y se cebaron a las líneas de entrada como se describe en los ejemplos anteriores. Las columnas previamente se separaron y se limpiaron de cualquier material unido usando dos volúmenes de columna (VC) de un tampón de ácido cítrico con un pH de 2,1 y dos VC de un tampón cáustico de hidróxido de sodio 0,1 M bombeados a 150 cm/h en una dirección de flujo descendente y se incubaron sin flujo a 20 °C durante 15 minutos como se describe en los ejemplos anteriores. Se utilizaron cinco VC de tampón de equilibrio con una composición de fosfato de sodio 50 mM a un pH 7,0 y una conductividad de 6,0 mS/cm antes de aplicar la carga en todos los ciclos de cromatografía, se usaron otros tres VC del mismo tampón después de aplicar cargas para lavar los compuestos unidos de manera débil y se usaron cinco VC de acetato de sodio 60 mM a un pH de 3,6 para eluir el producto unido en todos los ciclos.

25 Se aplicaron los mismos monitores según la metodología anterior. La carga contenía un anticuerpo monoclonal expresado extracelularmente a un valor de 3,9 mg/ml de una célula hospedadora de mamífero que se filtró en profundidad para eliminar células enteras y fragmentos grandes, y el filtrado se aplicó a la columna a 150 cm/h. La capacidad de unión dinámica calculada fue de 47,9 mg/ml de matriz por ciclo a una carga del 90 % del nivel de ruptura del 10 % y se calculó que la productividad era 20,9 mg/ml de matriz/hora para el proceso discontinuo tradicional. Se determinó que la capacidad de unión estática era 77,2 mg/ml, que corresponde a un 143 % de la capacidad de unión dinámica en flujo descendente en exceso de la capacidad de unión estática normal de la matriz. Las mediciones del flujo continuo emergente se utilizaron de manera similar para modelar el proceso de avance y definir parámetros optimizados para la sobrecarga y el reciclaje de acuerdo con la metodología propuesta. Estos ajustes se utilizaron luego para operar el proceso de purificación con un ciclo inicial sobrecargado hasta un estímulo de carga de 84,1 mg/ml, tres ciclos de cromatografía posteriores sobrecargados y reciclados hasta una capacidad de funcionamiento de 68,5 mg/ml, y un ciclo de cromatografía final con poca carga hasta una capacidad de funcionamiento real alcanzada en la matriz durante un ciclo de cromatografía en este experimento fue de 68,5 mg/ml que corresponde a un 88,7 % de la capacidad máxima de unión estática de la matriz y operó con una productividad de 21,0 mg/ml de matriz/hora para los ciclos de ejecución. Esto se comparó con una metodología discontinua tradicional equivalente en condiciones idénticas, pero sin las etapas de sobrecarga y reciclaje. Los resultados y la comparación con el funcionamiento tradicional se muestran en la *Figura 14*.

### Bibliografía

55 Kontermann, RE (2012). "Dual targeting strategies with bispecific antibodies". *MAbs* 4 (2): 182-197.

Mahajan, E., A. George y B. Wolk (2012). "Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography". *J Chromatogr A* 1227: 154-162.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de
  - 5 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente a una matriz cromatográfica operada de tal manera que la proteína se une a la matriz cromatográfica hasta que se alcanza del 40 al 100 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica;
  - b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y
  - 10 c) en otro ciclo de cromatografía operativo, volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente en la misma matriz cromatográfica operada de manera que la proteína de interés se una a la matriz cromatográfica hasta que se alcance del 40 al 100 % de la capacidad de unión estática de la matriz cromatográfica.
2. Un proceso para la purificación de una proteína de interés a partir de una mezcla que comprende las etapas de:
  - 15 a) en un ciclo de cromatografía operativo, cargar un primer volumen de una mezcla que contiene la proteína de interés desde un primer recipiente hasta una matriz cromatográfica operada de tal manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica;
  - b) recoger el flujo continuo que contiene la proteína de interés no unida en un segundo recipiente, y
  - 20 c) en otro ciclo cromatográfico operativo volver a cargar el flujo continuo del segundo recipiente y cargar un segundo volumen de proteína de interés del primer recipiente en la misma matriz cromatográfica, operada de tal manera que se exceda la capacidad de unión dinámica de la matriz cromatográfica.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde en la etapa (a) la carga de la proteína de interés se detiene cuando se alcanza al menos el 40 % de la capacidad máxima de unión estática.
- 25 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el ciclo de cromatografía operativo adicional es el ciclo de cromatografía inmediatamente posterior.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde la recogida del flujo continuo se inicia a una primera concentración predeterminada de proteína de interés en el flujo continuo y se detiene a una segunda concentración predeterminada de proteína de interés en el flujo continuo.
- 30 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde una fracción predeterminada del flujo continuo se recoge en el segundo recipiente.
- 35 7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el flujo continuo se procesa antes de volver a cargarse en la matriz cromatográfica, seleccionándose el procesamiento de movimiento o agitación, dilución, ajuste de la concentración, ajuste del pH, ajuste de la conductividad, intercambio de tampones o disolventes, enfriamiento o calentamiento o cualquier combinación de los mismos.
- 40 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cromatografía se selecciona de cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto, cromatografía quiral o cromatografía dieléctrica.
- 45 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el proceso comprende tres etapas de cromatografía.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el proceso comprende cromatografía de Proteína A seguida de cromatografía de intercambio catiónico seguida de cromatografía de intercambio aniónico.
- 50 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde una, dos, tres o todas las matriz/matrices cromatográficas es/son una columna de cromatografía.
12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 55 13. Un método de fabricación de una proteína de interés que comprende el proceso para la purificación de la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

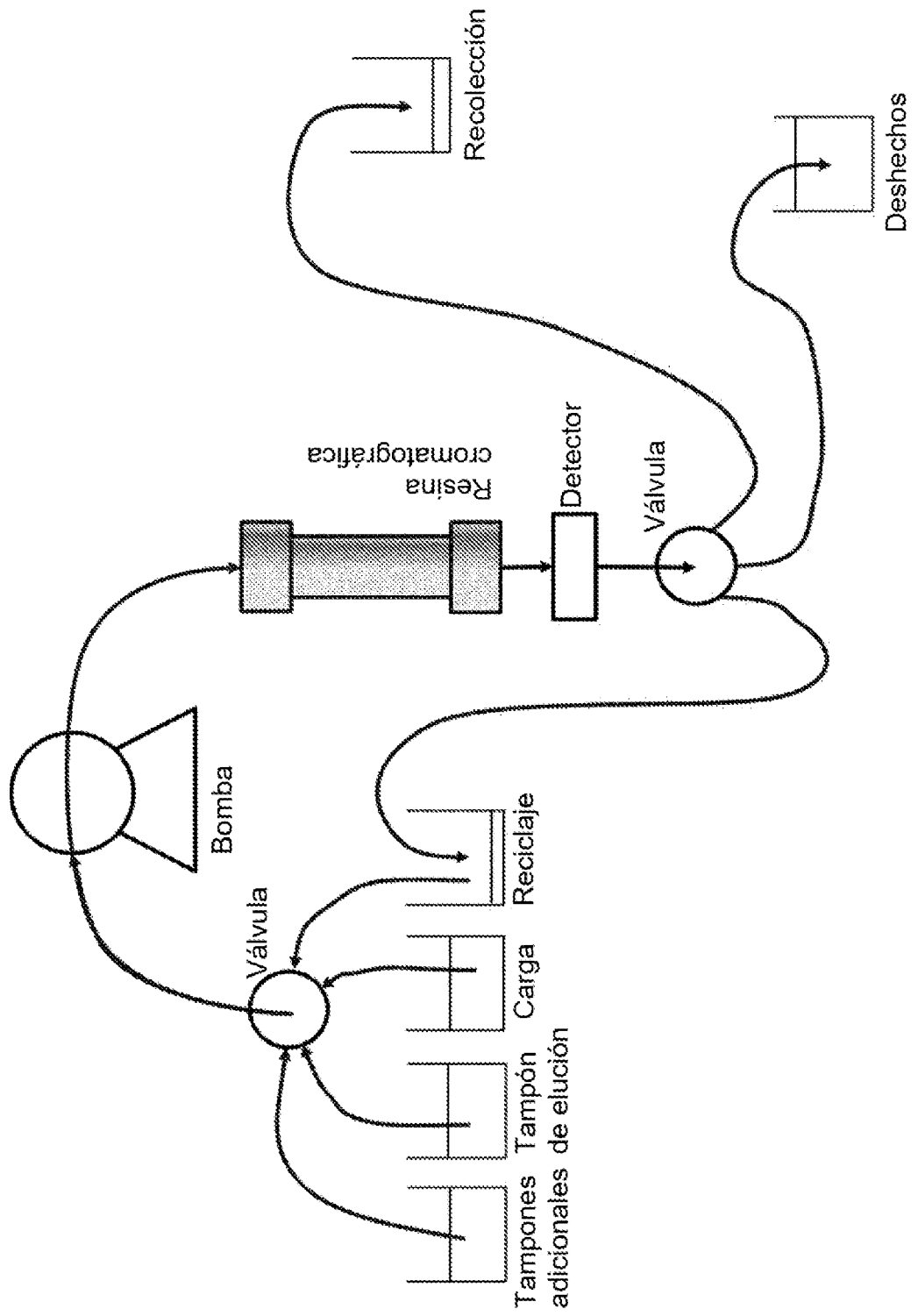


Fig. 1

Fig. 2

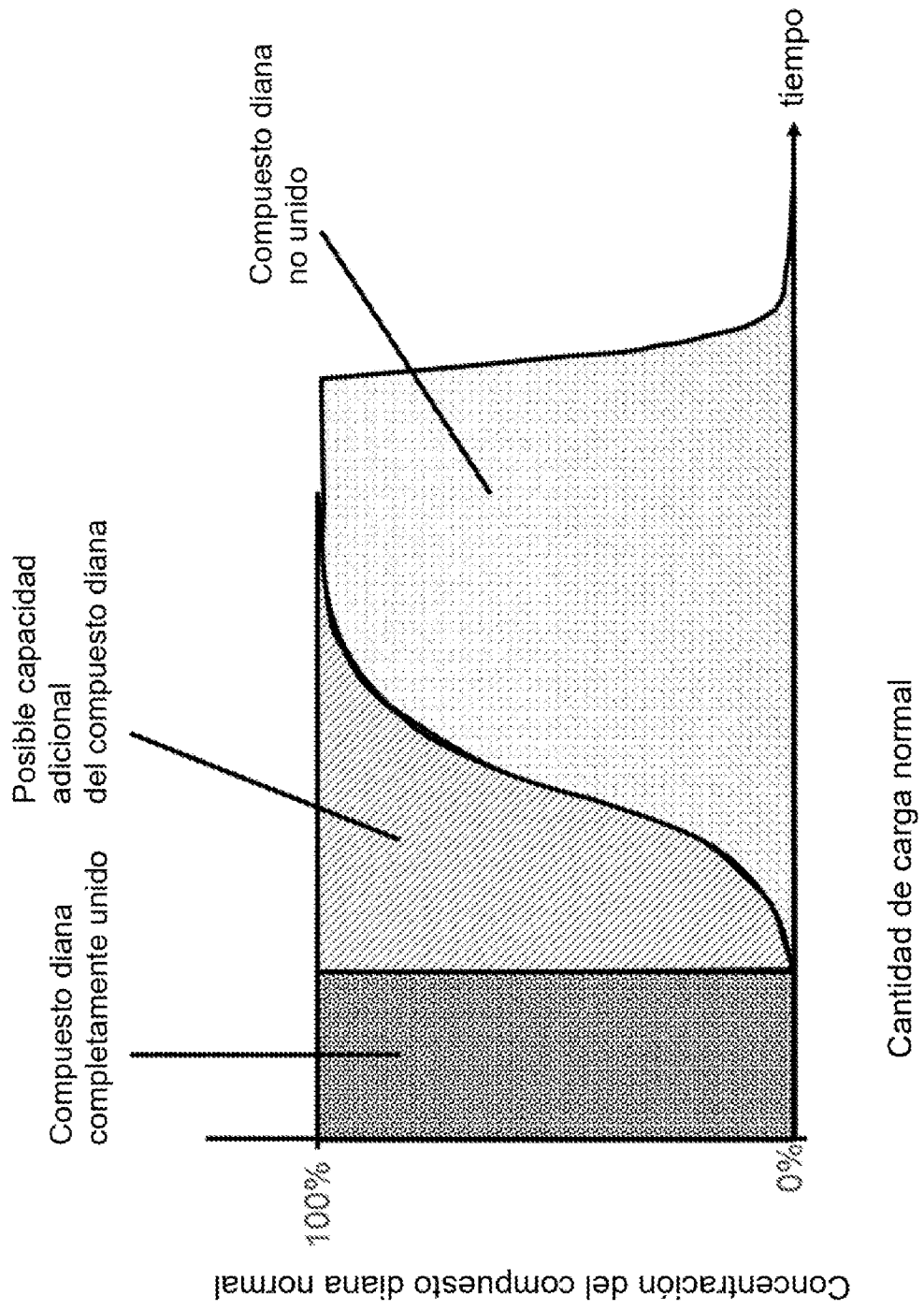
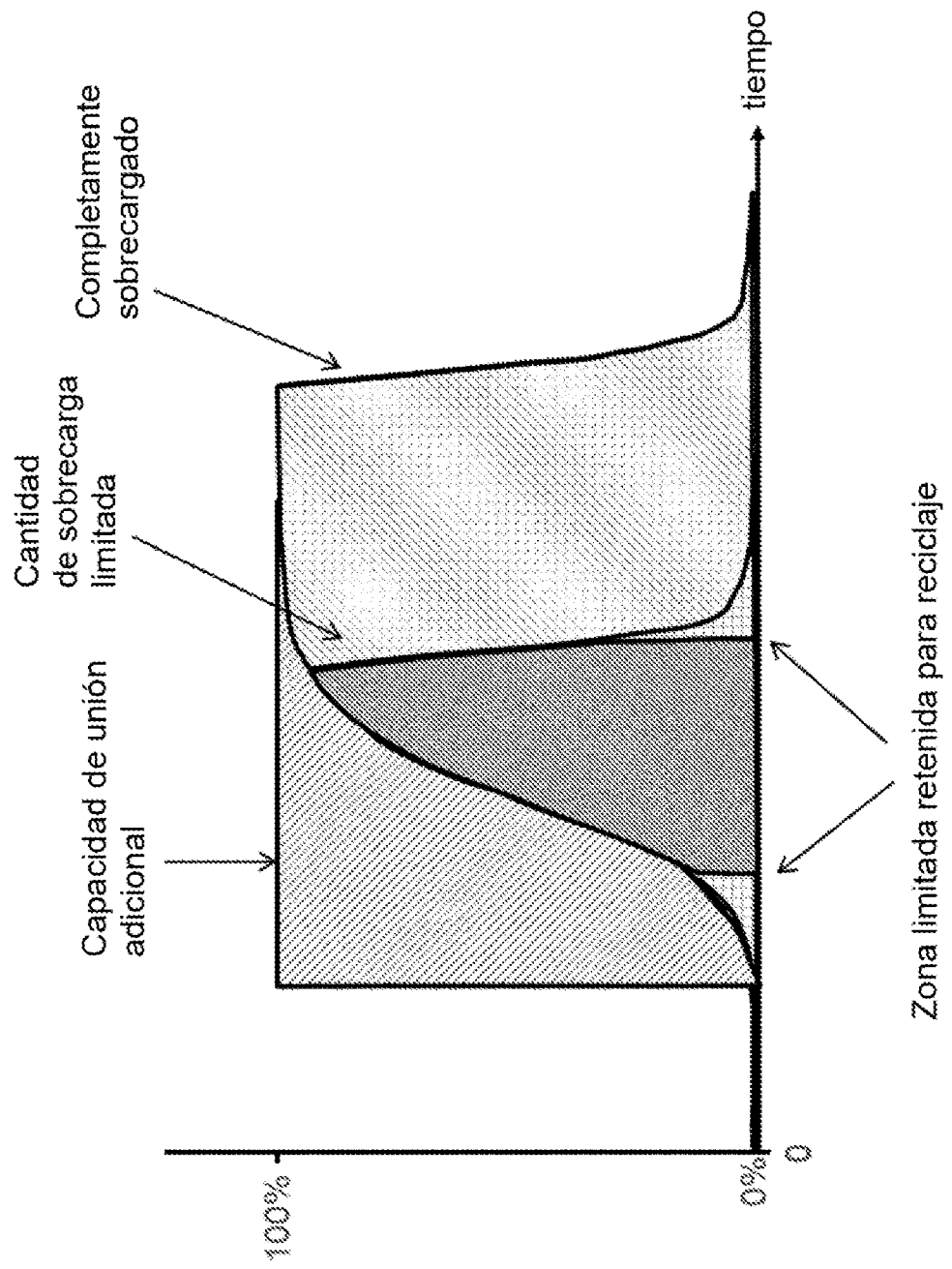


Fig. 3



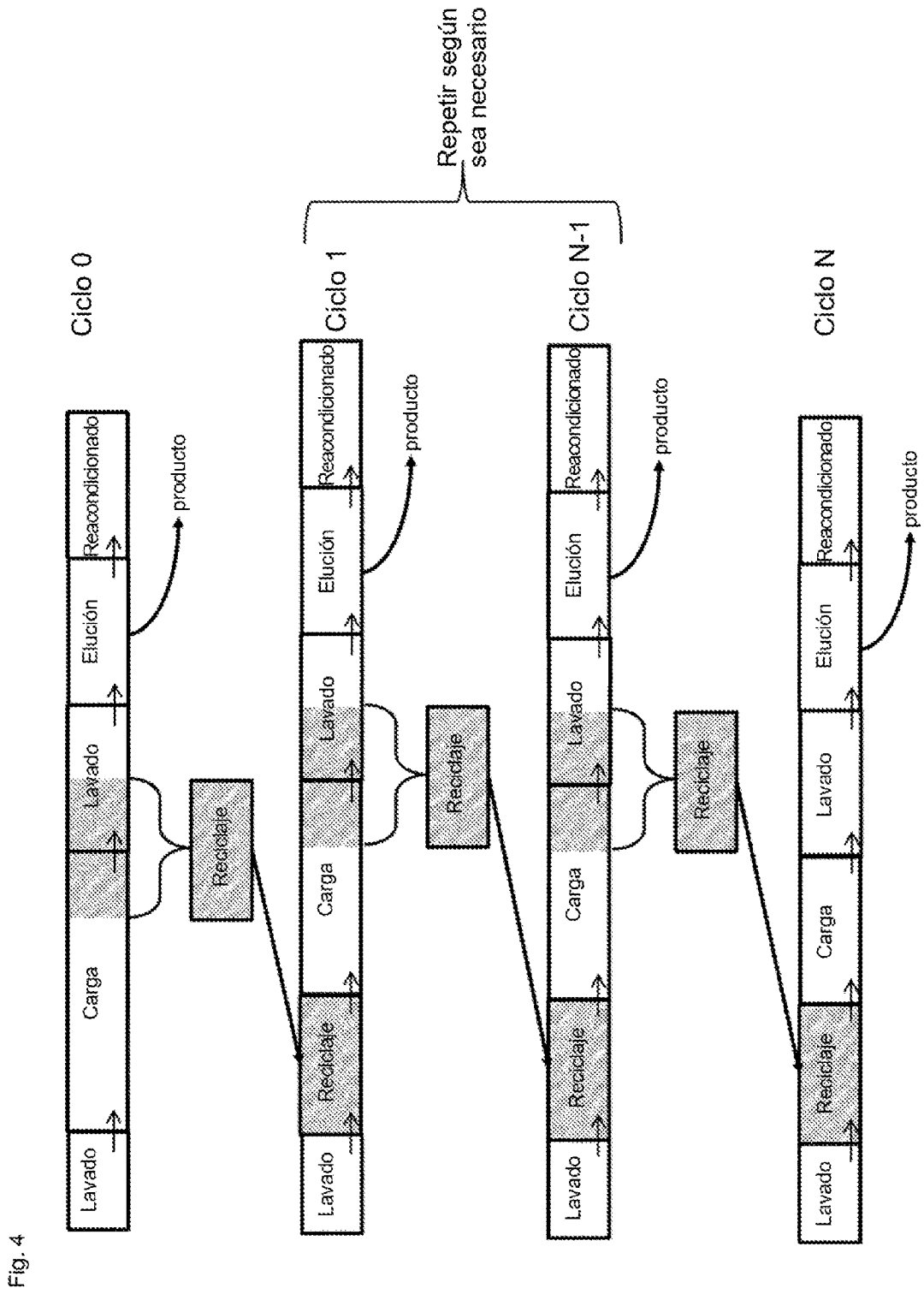


Fig. 4

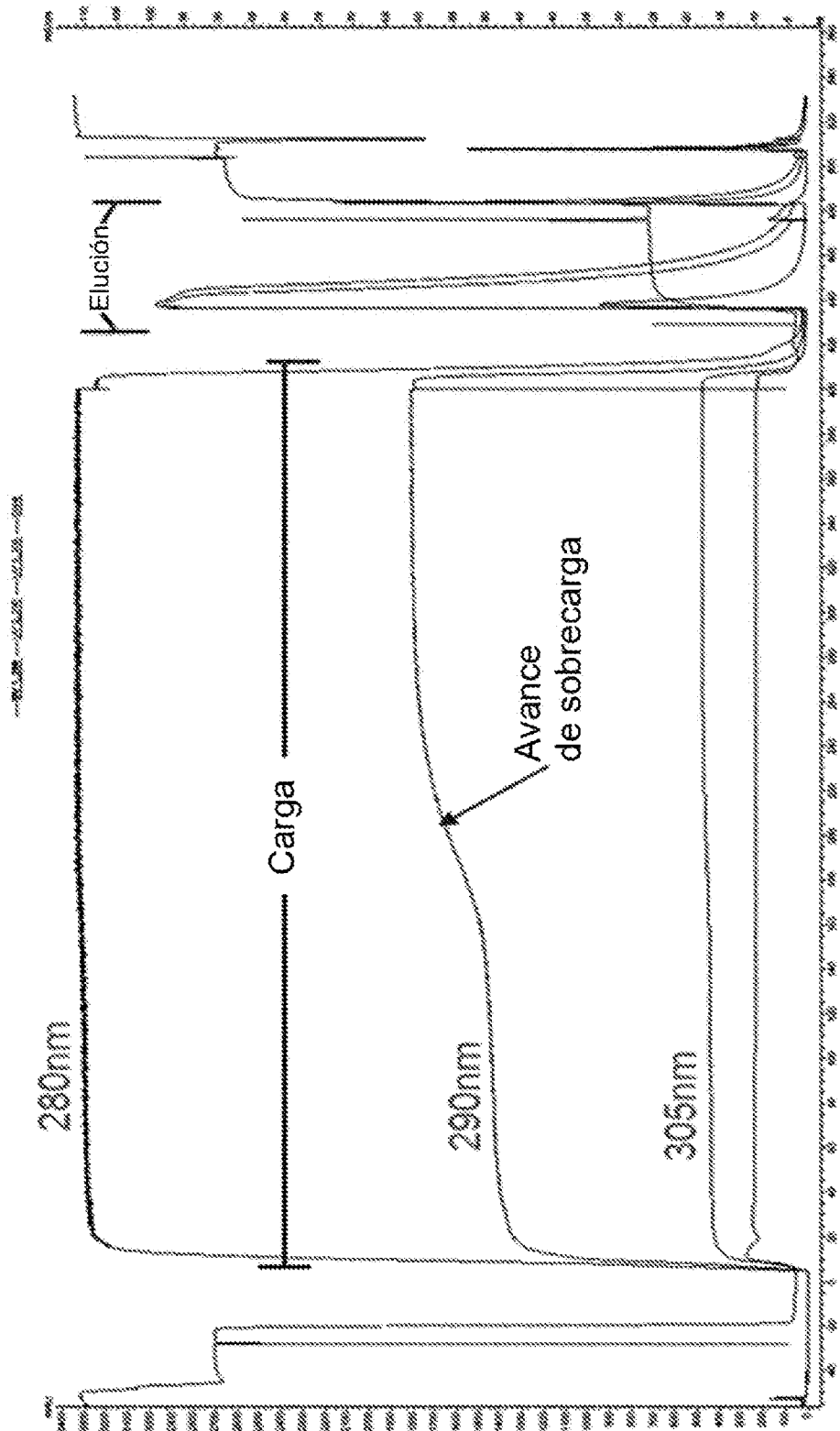


Fig. 5

Fig. 6

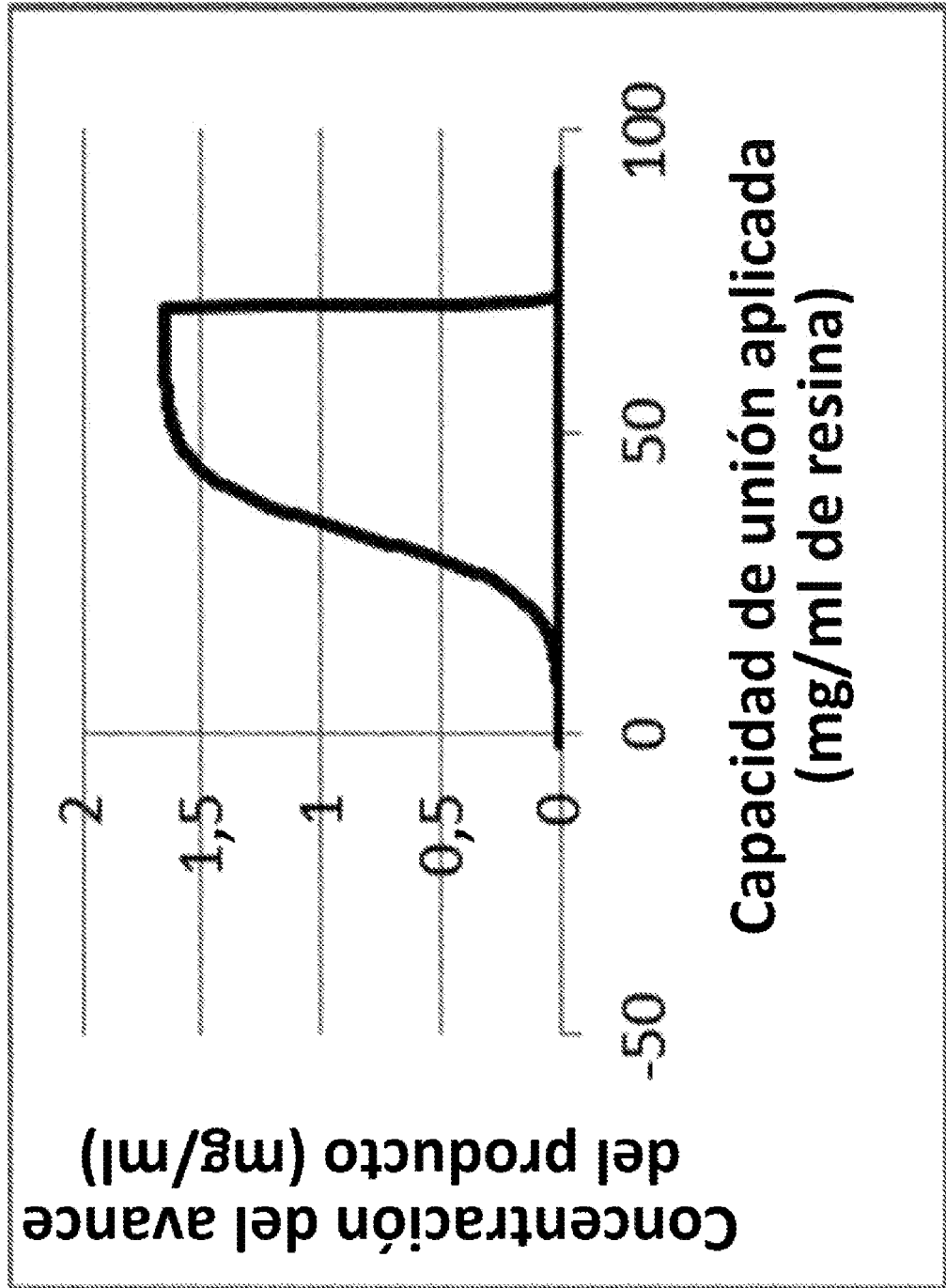


Fig.7

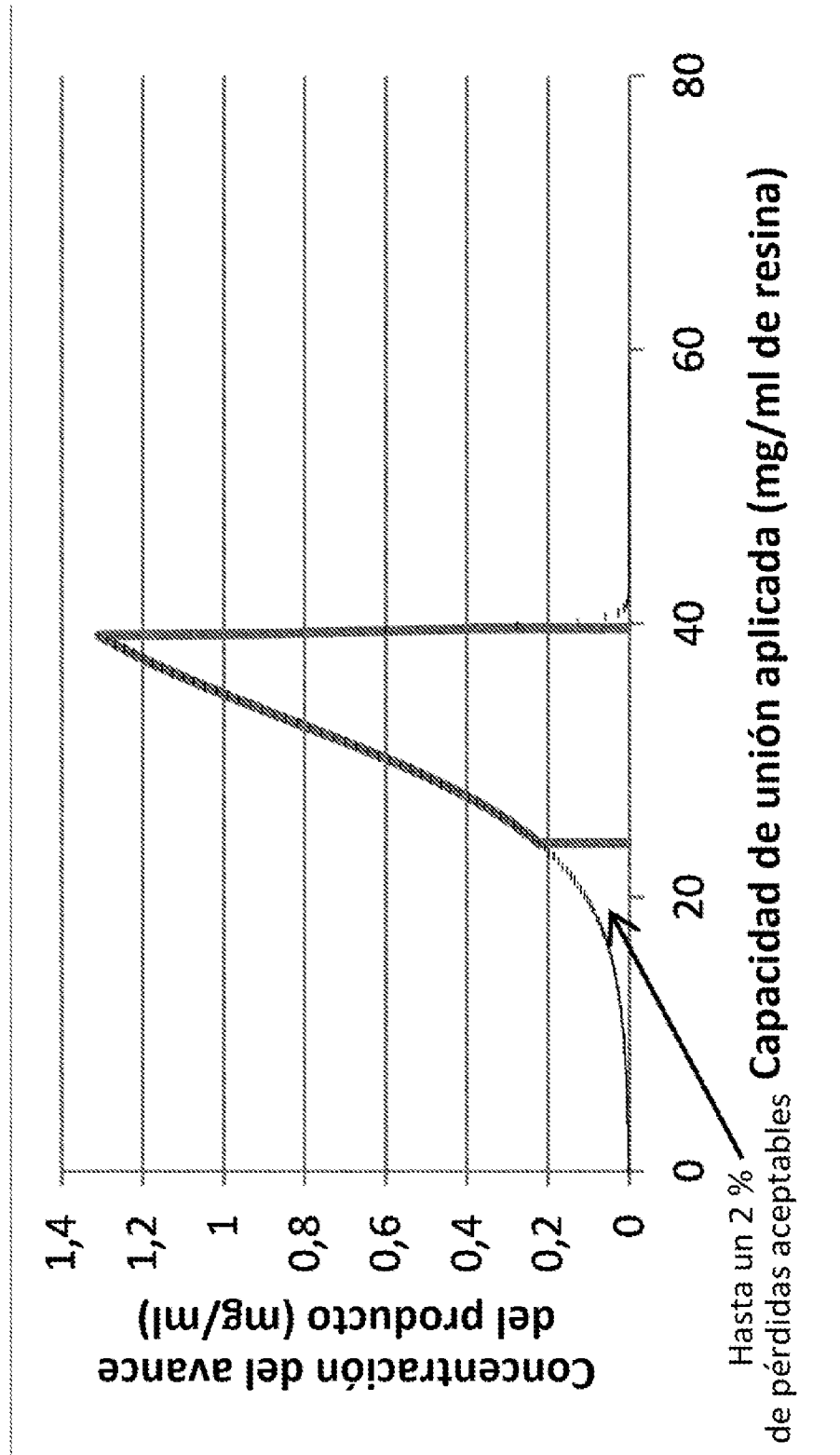


Fig. 8

	Ciclo 1	Ciclos 2-4	Ciclo 5
Separación (VC)	2	2	2
Limpieza (VC)	2	2	2
Refención CIP (minutos)	15	15	15
Equilibrio (VC)	3	3	3
Reciclaje (VC)	0	9,45	9,45
Carga nueva (VC)	15,44	11,27	7,89
Carga nueva y recolección de reciclaje (VC)	8,12	8,12	0
Lavado y recolección de reciclaje (VC)	1,33	1,33	0
Lavado (VC)	1,67	1,67	3
Elución (VC)	5	5	5
tiempo total (minutos)	66,42	73,45	58,12

Fig. 9

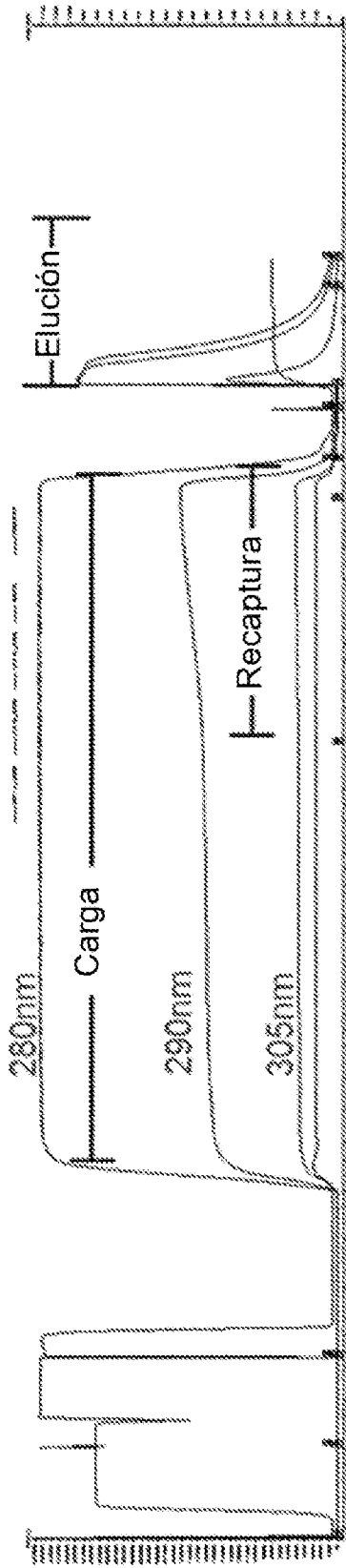


Fig. 10

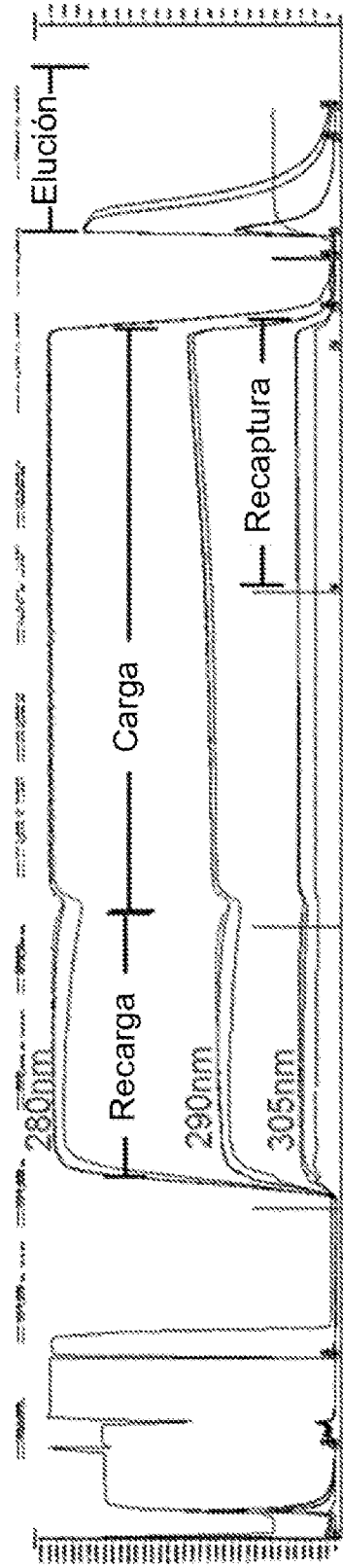


Fig. 11

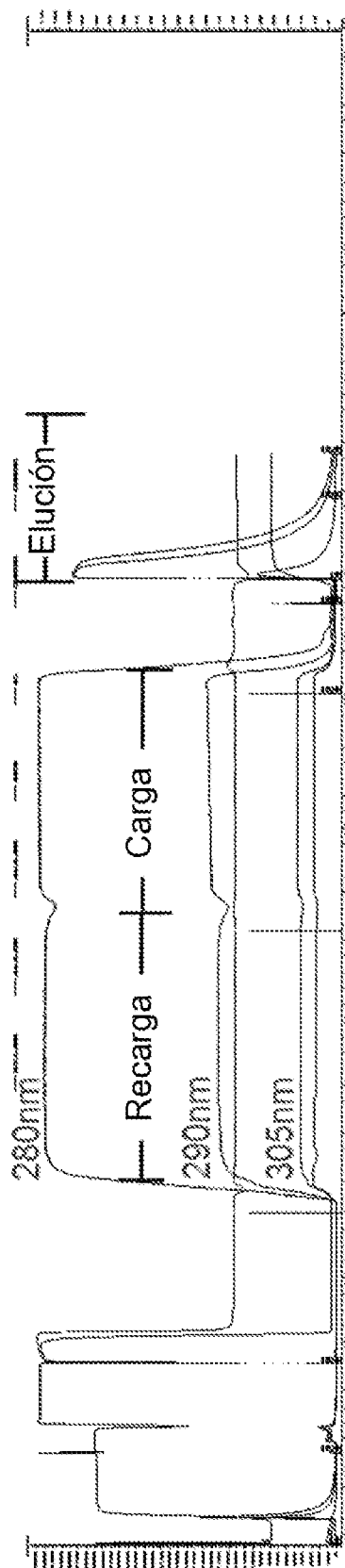


Fig. 12

	Funciona- miento tradicional	Ciclo de inicio	Ciclo de funciona- miento 1	Ciclo de funciona- miento 2	Ciclo de funciona- miento 3	Ciclo final	nuevo promedio del ciclo de funcio- namiento	nuevo total	nueva mejora total
carga mg/ml (matriz)	20,03	39,11	32,19	32,19	32,19	7,89	32,19	28,71	43,30%
conc. de eluido mg/ml	6,98	9,63	9,72	9,75	9,71	7,58	9,73	9,28	32,92%
vol. de eluido ml	26,16	30,43	30,23	29,80	30,08	25,41	30,04	29,19	11,58%
cantidad de eluido mg	182,60	293,04	293,84	290,55	292,08	192,61	292,16	270,82	48,32%
rendimiento %	97,86%	80,46%*	98,02%	96,93%	97,44%	262,12%*	97,46%	101,28%	3,82%
impurezas %	11,54%	7,66%	7,98%	7,79%	7,77%	12,19%	7,85%	8,66%	33,26%
productividad mg/ml/hora	23,52	28,37	25,65	25,65	25,65	20,68	25,65	25,34	7,74%

Fig. 13

	Funciona- miento tradicional	Ciclo de inicio	Ciclo de funciona- miento 1	Ciclo de funciona- miento 2	Ciclo de funciona- miento 3	Ciclo final	nuevo promedio del ciclo de funcio- namiento	nuevo total	nueva mejora total
carga mg/ml (matriz)	29,68	63,21	56,98	56,98	56,98	30,96	56,98	53,03	78,66%
conc. de eluido mg/ml	~	14,20	14,30	14,30	14,20	11,90	14,27	13,78	~
vol. de eluido ml	~	34,76	36,60	36,41	36,52	33,26	36,51	35,51	~
cantidad de eluido mg	~	493,59	523,38	520,66	518,58	395,79	520,88	489,33	~
rendimiento %	>98%	83,84%*	98,62%	98,11%	97,72%	137,26%*	98,15%	99,09%	~1%
productividad mg/ml/hora	15,25	35,72	28,90	28,90	28,90	17,47	25,65	17,42	14,25%

Fig. 14

	Funciona- miento tradicional	Ciclo de inicio	Ciclo de funciona- miento 1	Ciclo de funciona- miento 2	Ciclo de funciona- miento 3	Ciclo final	nuevo promedio del ciclo de funcio- namiento	nuevo total	nuevo cambio total
carga mg/ml (matriz)	47,9	84,1	68,5	68,5	68,5	22,9	68,5	62,5	30,5%
conc. de eluido mg/ml	21,0	32,9	31,9	31,3	31,4	17,2	31,2	28,8	37,8%
vol. de eluido VC	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9	2,1	2,1	93,6%
cantidad de eluido mg	8780	12900	12600	12400	12400	6200	12500	11300	28,7%
rendimiento %	96,2	80,7*	96,5	95,2	95,3	142,4*	95,7	94,9	-1,3%
productividad mg/ml/hora	20,9	16,3	21,1	20,9	20,9	41,6	21,0	19,7	-5,7%