

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 416**

51 Int. Cl.:

C07K 1/12 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2017** **PCT/IB2017/056395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018** **WO18073717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2017** **E 17804655 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021** **EP 3500586**

54 Título: **Procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de proteína terapéutica**

30 Prioridad:

17.10.2016 IN 201621035458

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

12.11.2021

73 Titular/es:

ENZENE BIOSCIENCES LTD. (100.0%)
Plot No. 165/1/26, Block T, Bhosari MIDC
Pune, Maharashtra 411026, IN

72 Inventor/es:

GADGIL, HIMANSHU;
BANERJEE, ABIR;
DYAGA, GOPAL;
PANKHANIA, ASHVIN;
LONDHE, HARSHITA y
RAO, DEEPIKA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 876 416 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de proteína terapéutica

Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere al campo técnico de la fabricación biológica de proteínas terapéuticas. En particular, la presente divulgación se refiere a un procedimiento continuo para la fabricación de proteínas terapéuticas con heterogeneidad reducida.

Antecedentes

- 10 La descripción de los antecedentes incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No se trata de un reconocimiento de que algo de la información proporcionada en la presente memoria sea técnica anterior o relevante para la invención actualmente reivindicada, o de que alguna publicación referida específica o implícitamente sea técnica anterior.

- 15 La identificación de la importancia de las proteínas terapéuticas ha conducido a una nueva revolución en la industria farmacéutica. Sin embargo, en la producción de proteína terapéutica frecuentemente se observan sus isoformas cargadas que interfieren en gran medida en los procedimientos de aislamiento y purificación necesarios para alcanzar altos rendimientos y calidad en el producto.

Usualmente se utiliza enzima carboxipeptidasa para la preparación de la forma homogénea de proteína terapéutica tal como anticuerpo monoclonal, ya que cataliza la hidrólisis del enlace peptídico C-terminal. La carboxipeptidasa B es una carboxipeptidasa que actúa preferentemente sobre aminoácidos básicos, tales como arginina y lisina.

- 20 En la técnica anterior se han descrito diversos métodos para reducir la cantidad de heterogeneidad en proteínas terapéuticas. Por ejemplo, el documento US5126250 describe un método para reducir la heterogeneidad de anticuerpos secretados a partir de células productoras de anticuerpos mediante conversión de los anticuerpos más heterogéneos en una forma sustancialmente homogénea antes de la purificación.

El documento WO20120147053 describe un método para reducir la heterogeneidad en anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular.

- 25 El documento US9062337 describe la utilización de enzima monooxigenasa que produce una amidación de la peptidilglicina alfa para truncar el residuo C-terminal de péptidos.

Diversos documentos de la técnica anterior también han descrito la inmovilización de enzimas para la purificación y producción de proteínas terapéuticas. Chemuru et al., Biopolymers 2014 Mar; 102(2): 206-221, describen la eliminación del residuo lys de péptido A β utilizando carboxipeptidasa B inmovilizada en perlas de agarosa.

- 30 Kudryavtseva et al., Pharm Chem J (1995) 29: 70 describen la inmovilización de tripsina y carboxipeptidasa B en sílices modificadas para la conversión de proinsulina en insulina. Yasuhara y Ohashi, Appl Biochem Biotechnol (1994) 44: 151, describen la inmovilización de una pocarboxipeptidasa B en sefarosa para eliminar residuos C-terminales de péptidos.

- 35 Wei Zhang et al: "Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 30, nº 5, páginas 1479-1490, 1 de enero de 2003 (01-01-2003), describen la purificación de anticuerpos mediante la reducción de isoformas básicas utilizando cromatografía.

- 40 Kim Do Gyun et al: "Effects of carboxypeptidase B treatment and elevated temperature on recombinant monoclonal antibody charge variants in cation-exchange chromatography analysis", Archives of Pharmacal Research, Natl. Fisheries University, Pusan, KR, vol. 39, nº 10, páginas 1472-1481, 13 de agosto de 2016 (13-08-2016), describen el tratamiento de anticuerpos con carboxipeptidasa B (CPB) soluble para reducir isoformas básicas.

- 45 El documento US9657056 describe procedimientos integrados y continuos para fabricar una sustancia farmacéutica de proteína terapéutica, en los que el medio de cultivo líquido procedente del biorreactor de perfusión se transfiere en MCCS1 para la captura en las tres primeras columnas de cuatro columnas, y el eluato de éstas se carga y se incuba en la cuarta columna para inactivación viral. El eluato del MCCS1 que contiene la proteína terapéutica recombinante se introduce de forma continua en un segundo sistema de cromatografía de múltiples columnas (MCCS2, por sus siglas en inglés); y la proteína terapéutica recombinante se purifica y se pule utilizando el MCCS2.

- 50 La eliminación de la heterogeneidad de residuos C-terminales se lleva a cabo normalmente en cultivo discontinuo mediante la adición de carboxipeptidasa directamente al biorreactor en el medio de cultivo o inmediatamente después de la etapa cromatográfica. Sin embargo, la adición de enzima requiere muchas etapas de optimización en términos de tiempo de incubación, temperatura, pH, etc. Además, el coste elevado de las enzimas conduce a un incremento del coste total del procedimiento.

Últimamente, el procesamiento biológico continuo ha adquirido un gran interés debido a diversas ventajas, como operación en estado estacionario, pequeño tamaño de los equipos, gran productividad volumétrica, flujo de proceso simplificado, tiempo de ciclo bajo y coste de inversión reducido.

5 Si bien en la técnica anterior se ha descrito una serie de estrategias para reducir la heterogeneidad de proteínas terapéuticas, ninguna de ellas describe un procedimiento continuo para producir proteínas terapéuticas con heterogeneidad reducida. La técnica anterior tampoco proporciona ningún procedimiento que permita la reducción de la heterogeneidad en una proteína antes de la purificación.

La presente invención satisface las necesidades existentes, y otras, y en general supera las deficiencias halladas en la técnica anterior.

10 **Compendio de la invención**

Un objeto de la presente divulgación consiste en proporcionar un procedimiento de fabricación biológica que permita la producción continua de proteína terapéutica con heterogeneidad reducida.

Otro objeto de la presente divulgación consiste en proporcionar un procedimiento continuo que permita reducir la heterogeneidad en una proteína terapéutica antes de la etapa de purificación.

15 Otro objeto de la presente divulgación consiste en proporcionar un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica sin comprometer el rendimiento global de la producción de proteína terapéutica.

20 Otro objeto de la presente divulgación consiste en proporcionar un procedimiento de fabricación biológica altamente flexible y económico que pueda ser utilizado para producir de forma continua proteína terapéutica con heterogeneidad reducida.

La presente invención se orienta a proporcionar un procedimiento que permita la producción continua de una proteína terapéutica con heterogeneidad reducida.

Además, la presente invención se orienta a proporcionar un procedimiento de purificación continua que incluya una etapa de reducción de isoformas básicas de proteínas.

25 Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a un procedimiento de fabricación biológica que posibilita la producción continua de una proteína terapéutica con heterogeneidad reducida. El procedimiento de fabricación biológica descrito en la presente memoria utiliza un sistema de cromatografía de múltiples columnas que realiza las operaciones unitarias consistentes en reducir la heterogeneidad en una proteína terapéutica, capturar la proteína terapéutica e inactivar virus, purificar la proteína terapéutica y pulir la proteína terapéutica purificada.

30 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de purificación continua para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, incluyendo el procedimiento una etapa de reducción de una o más isoformas básicas de la proteína terapéutica en un sistema de cromatografía de múltiples columnas individual que comprende al menos dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas que realizan en cada caso una operación unitaria diferente, en el que el sistema de cromatografía de múltiples columnas individual puede
35 incluir una columna que comprende carboxipeptidasa B inmovilizada en sefarosa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, el procedimiento puede incluir las etapas consistentes en:

(a) proporcionar un sistema de cromatografía de múltiples columnas que comprende una primera columna, una segunda columna, una tercera columna y una cuarta columna;

40 (b) introducir una cosecha de cultivo celular que comprende una proteína terapéutica en la primera columna, con lo que se reduce la heterogeneidad de la proteína terapéutica; comprendiendo la primera columna carboxipeptidasa B inmovilizada en sefarosa;

(c) introducir un flujo continuo procedente de la primera columna en la segunda columna, con lo que se captura la proteína terapéutica en el flujo continuo de la primera columna;

45 (d) introducir un eluato que comprende la proteína terapéutica procedente de la segunda columna en la tercera columna para purificar la proteína terapéutica; e

(e) introducir un flujo continuo que comprende la proteína terapéutica procedente de la tercera columna en la cuarta columna para pulir la proteína terapéutica.

50 En una realización, un eluato que comprende una proteína terapéutica procedente de la segunda columna se puede recoger y mantener en un depósito a un pH bajo para la inactivación viral. Después de la inactivación viral, el eluato de la segunda columna se puede someter a ajustes de pH y conductividad antes de introducirlo en la tercera columna.

En una realización, un flujo continuo que comprende una proteína terapéutica procedente de la tercera columna se puede someter a ajustes de pH y conductividad antes de introducir dicho flujo continuo en la cuarta columna.

En una realización, la primera, segunda, tercera y cuarta columnas del sistema de cromatografía de múltiples columnas se pueden conectar en orden secuencial en serie o en paralelo.

- 5 En una realización, la primera columna reduce la heterogeneidad de una proteína terapéutica mediante la reducción de una proporción de isoformas básicas de la proteína terapéutica.

En una realización, la segunda columna puede ser una columna de cromatografía de afinidad.

- 10 En una realización, la tercera columna y la cuarta columna se pueden seleccionar en cada caso entre el grupo que consiste en una columna de cromatografía de intercambio aniónico, una columna de cromatografía de intercambio catiónico, una columna de cromatografía de interacción hidrófoba y una columna de cromatografía multimodal.

En una realización, las proteínas terapéuticas que se pueden preparar mediante el procedimiento de la presente divulgación o utilizar en el mismo pueden incluir un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, una enzima, una proteína modificada por ingeniería genética, una proteína inmunógena, un fragmento de proteína, una inmunoglobulina y cualquier combinación de los mismos.

- 15 Según algunas realizaciones de la presente divulgación, una proteína terapéutica tratada mediante el procedimiento de la presente divulgación o resultante del mismo se puede formular en una composición farmacéutica sin ninguna etapa adicional de purificación y/o descontaminación.

Según algunas realizaciones de la presente divulgación, el sistema de cromatografía de múltiples columnas usado en el presente procedimiento se puede operar en un modo continuo y en estado estacionario.

- 20 Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la materia objeto de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar una mayor comprensión de la presente divulgación, y se incorporan en esta memoria descriptiva y constituyen una parte de la misma. Los dibujos ilustran realizaciones ejemplares de la presente divulgación y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la presente divulgación.

La FIGURA 1 ilustra un flujo de proceso ejemplar para el procesamiento continuo de proteína terapéutica en cuatro columnas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La FIGURA 2 muestra el cromatograma para dos columnas conectadas de forma continua en un sistema de purificación.

- 30 La FIGURA 3 muestra un perfil de cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con aproximadamente 25 min de TR.

La FIGURA 4 muestra una configuración de procesamiento continuo de la Columna 1 y la Columna 2 cuando funcionan con caudales iguales.

- 35 La FIGURA 5 muestra un perfil de cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con 20 min de TR.

La FIGURA 6 representa una superposición de datos de Análisis WCEX para Control y Elución de CPB-PA.

La FIGURA 7 muestra una configuración de procesamiento continuo de la Columna 1 y la Columna 2 cuando funcionan con caudales diferentes.

- 40 La FIGURA 8 muestra un perfil de cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con 2 min de TR.

La FIGURA 9 representa una superposición de datos de Análisis WCEX para Control y Elución de CPB-PA con 2 min de TR.

La FIGURA 10 muestra una superposición de datos de Análisis WCEX para Elución de CPB-PA con 20 min de TR y 2 min de TR respectivamente en la Columna 1 para mAb A.

- 45 La FIGURA 11 muestra un perfil de cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb B en modo continuo con 2 min de TR.

La FIGURA 12 muestra una superposición de datos de Análisis WCEX para control de mAb B y Elución de CPB-PA de mAb B con 2 min de TR.

La FIGURA 13 muestra un perfil de cromatograma de una columna de Proteína A procesada para mAb A como control en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 14 muestra un perfil de cromatograma para una densidad de carga de 10 mg/ml, 20 mg/ml y 40 mg/ml, respectivamente, en una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1) seguida por una columna de Proteína A para mAb A en modo continuo en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 15 muestra un perfil de cromatograma para una densidad de carga de 80 mg/ml en una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1) seguida por una columna de Proteína A para mAb A en modo continuo en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 16 representa superposiciones de datos de Análisis WCEX de Elución de CPB-PA neutralizada para densidad de carga individual con el Control.

La FIGURA 17 representa superposiciones de datos de Análisis WCEX de Elución de CPB-PA junto con control con diferentes densidades de carga en la Columna 1 para mAb A.

La FIGURA 18 muestra una configuración de ÄKTA pcc (4C PCC) para el procesamiento continuo de mAb A.

La FIGURA 19 muestra un perfil de cromatograma para el procesamiento continuo de mAb A en ÄKTA pcc (4C PCC).

La FIGURA 20 representa un control de superposiciones de datos de Análisis WCEX con Elución de Columna 2 y Elución de Columna 4 del procesamiento continuo.

Descripción detallada de la invención

A continuación se describen detalladamente realizaciones de la presente divulgación. Las realizaciones tienen el nivel de detalle necesario para comunicar claramente la divulgación. Sin embargo, la cantidad de detalles ofrecidos no pretende limitar las variaciones previstas de realizaciones.

A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la siguiente memoria descriptiva, la palabra "comprende" y las variaciones de la misma, como "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto, inclusivo, que es como "que incluye".

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrito en relación con la realización está incluido en al menos una realización. Por lo tanto, las apariciones de la frase "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Tal como se utiliza en la descripción en la presente memoria y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "una", "el" y "la" incluye una referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se utiliza en la descripción en la presente memoria, el significado de "en" incluye "en" y "sobre", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En algunas realizaciones, los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como concentración, condiciones de procesamiento, etc., usados para describir y reivindicar ciertas realizaciones de la invención deben entenderse como modificados en algunos casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, en algunas realizaciones, los parámetros numéricos establecidos en la descripción escrita son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se intentan obtener mediante una realización particular. En algunas realizaciones, los parámetros numéricos deben interpretarse a la luz del número de dígitos significativos notificados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de algunas realizaciones de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se notifican como precisos y viables.

La enumeración de los intervalos de valores en la presente memoria está destinada simplemente a servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor independiente que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual está incorporado en la memoria descriptiva como si estuviera indicado individualmente en la presente memoria.

Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que por lo demás el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a ciertas realizaciones en la presente memoria está destinado simplemente a ilustrar mejor la invención y por lo demás no plantea ninguna limitación al alcance de la invención reivindicada. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse en el sentido de que indica algún elemento no reivindicado esencial para poner en práctica la invención.

Los títulos y el resumen de la invención proporcionados en la presente memoria son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.

En la presente memoria se utilizan varios términos. En la medida en que un término utilizado en una reivindicación no esté definido a continuación, se le debe dar la definición más amplia que las personas de la técnica pertinente le han dado a ese término tal como se refleja en publicaciones impresas y patentes emitidas en el momento de la presentación.

5 La expresión "procedimiento continuo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier procedimiento que tenga dos o más etapas de procesamiento en una serie, en el que la salida de una etapa aguas arriba (operación unitaria) se transfiere a una etapa aguas abajo (operación unitaria) de forma continua hasta la etapa de cromatografía final, y en el que no es necesario que la etapa de procesamiento aguas arriba se complete antes de que se inicie la siguiente etapa de procesamiento. En un procedimiento continuo siempre se está moviendo alguna parte del producto
10 objetivo a través del sistema de procesamiento. Idealmente, un procedimiento continuo se regula de tal modo que, en la mayor medida posible, cada etapa u operación unitaria del procedimiento continuo se ejecute al mismo tiempo y sustancialmente con la misma tasa de producción. De esta manera se maximiza la compresión del tiempo de ciclo y se logra el tiempo de finalización más corto posible.

15 La expresión "transferencia continua" se refiere a una corriente de producto que se mueve de una operación unitaria aguas arriba a una operación unitaria aguas abajo, significa que las conexiones o enlaces entre las dos operaciones unitarias son tales que la operación unitaria aguas arriba transfiere una corriente de producto (directamente o a través de otros componentes) a la segunda operación unitaria (aguas abajo), y que la operación unitaria aguas abajo comienza antes de que se complete la operación unitaria aguas arriba (es decir, las dos operaciones unitarias sucesivas están procesando las corrientes de producto que fluyen hacia ellas simultáneamente durante al menos parte
20 de la ejecución del procedimiento global del que forman parte las dos operaciones unitarias).

La expresión "procedimiento de cultivo de células de perfusión", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al cultivo de perfusión que se lleva a cabo suministrando continuamente medio fresco al biorreactor y retirando constantemente el medio usado libre de células mientras se retienen las células en el reactor; por lo tanto se puede obtener una mayor densidad celular en los cultivos de perfusión en comparación con los cultivos continuos, ya que las
25 células se retienen dentro del reactor a través de un dispositivo de retención de células. La tasa de perfusión depende de la demanda de la línea celular, la concentración de nutrientes en la alimentación y el nivel de intoxicación.

La expresión "medio de cultivo celular" se refiere a todos los tipos de medios que se utilizan en el contexto del cultivo de células. Normalmente, un medio de cultivo celular comprende aminoácidos, al menos un carbohidrato como fuente de energía, oligoelementos, vitaminas, sales y posiblemente componentes adicionales (por ejemplo, para influir en el crecimiento celular y/o en la productividad y/o en la calidad del producto).
30

La expresión "proteína terapéutica" significa una proteína recombinante que ha sido suficientemente purificada o aislada de proteínas contaminantes, lípidos y ácidos nucleicos presentes en un medio de cultivo líquido o de una célula huésped (por ejemplo, de un mamífero, levadura o célula huésped bacteriana) y contaminantes biológicos (por ejemplo, contaminantes virales y bacterianos), y que se puede formular en un producto farmacéutico. Los ejemplos
35 representativos de proteína terapéutica incluyen un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, una enzima, una proteína modificada por ingeniería genética, una proteína inmunógena, un fragmento de proteína y una inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" se refiere al componente funcional del suero y a menudo se designa como una colección de moléculas (anticuerpos o inmunoglobulinas, fragmentos, etc.) o como una molécula. Una molécula de anticuerpo es capaz de unirse o reaccionar con un determinante antigénico específico, lo que a su vez puede conducir a efectos o mecanismos inmunológicos específicos.
40

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo producido por un solo clon de células o línea celular y que consiste en moléculas de anticuerpo idénticas.

45 El término "isoforma" se refiere a cualquiera de dos o más proteínas funcionalmente similares que tienen una secuencia de aminoácidos similar, pero no idéntica, y están codificadas por genes diferentes o por transcripciones de ARN del mismo gen al que se han eliminado diferentes exones.

El término "heterogeneidad" se refiere a un fenómeno en el que los anticuerpos secretados tienen varias formas bioquímicas discretas, tales como un aminoácido adicional o ácidos en el extremo carboxi de una o ambas cadenas pesadas del anticuerpo.

50 La expresión "reducir la heterogeneidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al procedimiento para la conversión de formas heterogéneas de anticuerpo monoclonal en una forma homogénea sustancialmente pura.

La expresión "tiempo de retención", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al tiempo en el que se eluye la mitad de la cantidad de un soluto del sistema cromatográfico. Está determinado por la longitud de la columna y la velocidad de migración del soluto; que puede estar en el intervalo de 1 a 30 minutos.

55 La expresión "sistema de cromatografía de múltiples columnas" o "MCCS" significa un sistema de un total de dos o más columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas interconectadas o conmutadas. Un ejemplo no

limitativo de un sistema de cromatografía de múltiples columnas incluye un sistema de cromatografía en contracorriente periódica (PCC, por sus siglas en inglés) que contiene un total de dos o más columnas cromatográficas y/o membranas cromatográficas interconectadas o conmutadas.

5 La expresión "eluato/filtrado" es un término de la técnica y significa un fluido que se emite desde una columna cromatográfica o membrana cromatográfica que contiene una cantidad detectable de una proteína terapéutica recombinante.

10 Algunas realizaciones de la presente divulgación se refieren a un procedimiento de fabricación biológica que permite la producción continua de una proteína terapéutica con heterogeneidad reducida. El procedimiento de fabricación biológica descrito en la presente memoria utiliza un sistema de cromatografía de múltiples columnas que realiza las operaciones unitarias consistentes en reducir la heterogeneidad en una proteína terapéutica, capturar la proteína terapéutica e inactivar virus, purificar la proteína terapéutica y pulir la proteína terapéutica purificada.

15 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, incluyendo el procedimiento la reducción de una o más isoformas básicas de la proteína terapéutica en un único sistema de cromatografía de múltiples columnas que comprende al menos dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas que realizan en cada caso operaciones unitarias diferentes, en el que el sistema de cromatografía de múltiples columnas puede incluir una columna que comprende carboxipeptidasa B inmovilizada en sefrosa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, el procedimiento puede incluir las etapas consistentes en:

- 20 (a) proporcionar un sistema de cromatografía de múltiples columnas que comprende una primera columna, una segunda columna, una tercera columna y una cuarta columna;
- (b) introducir una cosecha de cultivo celular que comprende una proteína terapéutica en la primera columna, con lo que se reduce la heterogeneidad de la proteína terapéutica; comprendiendo la primera columna carboxipeptidasa B inmovilizada en sefrosa;
- 25 (c) introducir un flujo continuo procedente de la primera columna en la segunda columna, con lo que se captura la proteína terapéutica en el flujo continuo de la primera columna;
- (d) introducir un eluato que comprende la proteína terapéutica procedente de la segunda columna en la tercera columna para purificar la proteína terapéutica; e
- 30 (e) introducir un flujo continuo que comprende la proteína terapéutica procedente de la tercera columna en la cuarta columna para pulir la proteína terapéutica.

En una realización, la primera, segunda, tercera y cuarta columnas del sistema de cromatografía de múltiples columnas se pueden conectar en orden secuencial en serie o en paralelo.

En una realización, la primera columna reduce la heterogeneidad de una proteína terapéutica mediante la reducción de una proporción de isoformas básicas de la proteína terapéutica.

35 En una realización, la segunda columna puede ser una columna de cromatografía de afinidad.

En una realización, la tercera columna y la cuarta columna se pueden seleccionar en cada caso entre el grupo que consiste en una columna de cromatografía de intercambio aniónico, una columna de cromatografía de intercambio catiónico, una columna de cromatografía de interacción hidrófoba y una columna de cromatografía multimodal.

40 Según algunas realizaciones de la presente divulgación, el sistema de cromatografía de múltiples columnas usado en el presente procedimiento se puede operar en un modo continuo y en estado estacionario.

45 En una realización preferida del procedimiento continuo, en la segunda columna se recoge o se carga continuamente un flujo continuo procedente de la primera columna, que comprende una proteína recombinante con heterogeneidad reducida. Un eluato procedente de la segunda columna se recoge de modo que el pH del mismo esté en el intervalo requerido para la inactivación viral de pH bajo, y se mantiene en un depósito durante el tiempo de incubación requerido. Después de la inactivación viral, el pH del eluato procedente de la segunda columna del sistema de cromatografía de múltiples columnas se ajusta al pH y la conductividad requeridos para la carga en la tercera columna mediante la adición de tampón/solución en línea. El eluato procedente de la segunda columna se carga en una tercera columna previamente equilibrada para la etapa de purificación intermedia con el fin de eliminar otras impurezas, como por ejemplo HCP, HcADN y virus. La tercera columna puede funcionar en modo de flujo continuo o de unión y elución. Un flujo continuo procedente de la tercera columna se recoge en un depósito y luego se ajustan el pH y la conductividad en línea en el sistema antes de cargarlo en la cuarta columna. También se puede cargar directamente en la cuarta columna si las condiciones de la muestra son las mismas que las del procedimiento continuo para las respectivas proteínas terapéuticas. A continuación, la proteína terapéutica se puede eluir de la cuarta columna si se opera en

modo de unión y elución o el flujo continuo se puede recoger si se opera en modo de flujo continuo. Por lo tanto, todo el procedimiento continuo para la fabricación de proteínas recombinantes terapéuticas se puede completar en una sola operación unitaria del sistema de cromatografía de múltiples columnas. La proteína terapéutica obtenida del procedimiento es pura, de gran productividad volumétrica, flujo de proceso simplificado, tiempo de ciclo bajo y coste de inversión reducido. En la FIGURA 1 se muestra un flujo de proceso ejemplar para el procesamiento continuo de proteína terapéutica en cuatro columnas.

En una realización, la primera columna del sistema de cromatografía de múltiples columnas realiza la operación unitaria consistente en reducir la heterogeneidad en una proteína terapéutica mediante la eliminación de isoformas de carga básicas de la proteína terapéutica.

En una realización, el procedimiento de eliminación de heterogeneidad se puede realizar utilizando cualquier sistema de cromatografía en el que se puedan conectar múltiples columnas que comprenden AKTA Avant 150, columnas ÄKTA pcc 2, columnas ÄKTA pcc 3, columnas ÄKTA pcc 4 y BioSMB PALL.

En una realización, las etapas de purificación intermedia y pulido se pueden realizar de forma continua usando diferentes métodos de cromatografía tales como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía multimodal. La cromatografía adecuada se puede seleccionar en función de los parámetros de proceso, la calidad deseada, la pureza, la recuperación y la productividad.

Los ejemplos de proteínas terapéuticas que se pueden preparar mediante el procedimiento de la presente divulgación o utilizar en el mismo pueden incluir un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, una enzima, una proteína modificada por ingeniería genética, una proteína inmunógena, un fragmento de proteína, una inmunoglobulina y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el anticuerpo monoclonal se selecciona entre un anticuerpo de origen natural o un anticuerpo recombinante seleccionado entre anticuerpo monoclonal, anticuerpo modificado, derivado de anticuerpo y fragmento de anticuerpo, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, la proteína terapéutica se puede seleccionar entre panitumumab, omalizumab, abagovomab, abcximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, amatuximab, anatumomab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, atinumab, tocilizumab, basilizumab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, besilesomab, bezlotoxumab, biciromab, blinatumomab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, cixutumumab, daclizumab, denosumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, figitumumab, golimumab, ibritumomab tiuxetán, igovomab, imgatuzumab, infliximab, inolimomab, inotuzumab, labetuzumab, lebrikizumab, moxetumomab, natalizumab, nivolumab, obinutuzumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ramucirumab, ranibizumab, rituximab, Secukinumab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, tucotuzumab, trastuzumab, Ustekinumab, vedolizumab, veltuzumab, zalutumumab, zatuximab, enzimas (por ejemplo, una galactosidasa (por ejemplo, una alfa-galactosidasa), Myozyme, o Cerezyme), proteínas (por ejemplo, proteínas inmunógenas o antigénicas o fragmentos de proteína (por ejemplo, proteínas para su uso en una vacuna), alglucosidasa alfa, laronidasa, abatacept, galsulfasa, lutropina alfa, factor antihemofílico, agalsidasa beta, interferón beta-1a, darbepoetina alfa, tenecteplasa, etanercept, factor de coagulación IX, hormona estimuladora del folículo, interferón beta-1a, imiglucerasa, dornasa alfa, epoetina alfa, insulina o análogos de insulina, mecasermina, factor VIII, factor VIIa, antitrombina III, proteína C, albúmina humana, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos, interleucina-11, laronidasa, idursufasa, galsulfasa, inhibidor de α -1-proteinasa, lactasa, adenosina desaminasa, activador del plasminógeno tisular, tiotropina alfa, β -galactosidasa ácida, β -galactosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa A y hexosaminidasa B.

En realizaciones preferidas, un medio de cultivo de proteína terapéutica se puede derivar de cualquier fuente. Por ejemplo, de un cultivo de células recombinantes (por ejemplo, un cultivo de células recombinantes bacterianas, de levadura o de mamíferos). El medio de cultivo se puede obtener de un cultivo celular discontinuo, un biorreactor discontinuo que contiene un cultivo de células que secretan la proteína terapéutica recombinante o un cultivo de células de perfusión. El medio de cultivo líquido también puede ser un medio de cultivo líquido clarificado procedente de un cultivo de células bacterianas o de levadura que secretan la proteína terapéutica recombinante.

En una realización de la presente divulgación, los residuos de lisina C-terminal en la cadena pesada de anticuerpos monoclonales se pueden trincar en un procedimiento continuo pasando una cosecha recuperada del cultivo de células de perfusión en una columna que tiene la enzima carboxipeptidasa B inmovilizada en sefarosa. La cosecha homogénea producida a partir de dicha reacción se transfiere además de forma continua a una columna de cromatografía de afinidad para la purificación adicional de anticuerpos monoclonales.

En una realización de la presente divulgación, el procedimiento continuo descrito en la presente memoria puede reducir la cantidad de enzima necesaria para la reducción de residuos C-terminales de anticuerpos monoclonales.

En una realización de la presente divulgación, un líquido de cultivo celular cosechado que procede continuamente de un biorreactor a través de una filtración tangencial alternativa se puede cargar en una columna inmovilizada con carboxipeptidasa B a un pH y luego se puede cargar continuamente en columnas de afinidad conectadas en tándem en un sistema de cromatografía continua o en serie o en paralelo en MCCS.

- 5 En ciertas realizaciones preferidas, la concentración de proteína en las células cultivadas está en un intervalo de concentración de 50-2.500 mg/l de líquido de cultivo celular cosechado.

En una realización, las isoformas básicas del anticuerpo monoclonal se pueden reducir en el intervalo de un 50 a un 100 por ciento.

- 10 Según algunas realizaciones de la presente divulgación, una proteína terapéutica tratada mediante el procedimiento de la presente divulgación o resultante del mismo se puede formular en una composición farmacéutica sin ninguna etapa adicional de purificación y/o descontaminación.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el procedimiento descrito en la presente memoria forma un sistema continuo de fabricación biológica para la proteína terapéutica.

- 15 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de preparación de resina para columna de sefrosa acoplada con carboxipeptidasa y la estabilidad de la resina utilizada para el procesamiento de proteína terapéutica.

Ejemplos

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no han de ser interpretados en modo alguno como limitaciones adicionales. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos descritos son meramente ilustrativos.

- 20 Ejemplo 1: Preparación de resina para el procedimiento

La resina se preparó mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Un polvo liofilizado de Sepharose™ 4B activado por CNBR se hinchó en agua y se lavó con HCl 1 mM. La resina se lavó adicionalmente con tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 10,0.
- 25 2) La enzima carboxipeptidasa B intercambiada con tampón se incubó con la resina en una proporción de 2:1 (CPB: Resina) a pH 10,0, durante la noche a 2-8 °C con agitación suave.
- 3) La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se añadió borohidruro de sodio en una proporción de 4 mg/ml de resina acoplada. La suspensión se incubó durante una hora a temperatura ambiente.
- 4) La resina se cargó en una columna y se lavó a fondo con tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0.
- 30 5) La columna se lavó adicionalmente con Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 9,0 antes de su uso.

Estabilidad y almacenamiento de resina Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR en casa:

Se comprobó que esta resina es estable durante más de un año con muchos ciclos, aún viable cuando se almacena a 2-8 grados C. Esta resina se puede utilizar para procesamiento continuo a temperatura ambiente para procesamiento continuo sin disminución en el rendimiento.

- 35 Ejemplo 2: Procedimiento para reducir variantes de anticuerpos

Se conectaron dos columnas de forma continua en un sistema de purificación en el que la entrada de la columna de CPB-Sepharose estaba conectada al sistema y la salida de la misma columna se usaba como entrada de la columna de proteína A. El flujo continuo que salía de la columna de CPB-Sepharose se cargó directamente en la columna de proteína A para la etapa de captura. Finalmente, la proteína se eluyó utilizando tampón de elución (Figura 2).

- 40 1. La columna de CPB-Sepharose se conectó en tándem con la columna de afinidad y la cosecha de cultivo celular clarificado procedente del cultivo celular de perfusión se cargó en la columna previamente equilibrada a pH 7,0, en la que se puede equilibrar a pH 6,5-9,0 durante más de aproximadamente 25 minutos de tiempo de contacto en la columna 1.
- 45 2. El flujo continuo que sale de la columna de CPB-Sepharose se cargó directamente en la columna de afinidad conectada con la salida de resina de CPB-Sepharose para la captura de proteína terapéutica.
3. El anticuerpo capturado en la segunda columna, que era una columna de afinidad, se eluyó finalmente con ácido acético 0,1 M, pH 3,0 y se neutralizó con base Tris 2 M. Se realizó un procesamiento de control con la misma cosecha que salía del biorreactor de perfusión y se cargaba directamente en la

proteína A para la etapa de captura. Las dos muestras de elución de proteína A se analizaron mediante WCEX-HPLC para el análisis de variantes de carga.

La FIGURA 2 muestra un cromatograma para dos columnas conectadas de forma continua en un sistema de purificación.

- 5 La FIGURA 3 muestra un Perfil de Cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con aproximadamente 25 min de TR.

Ejemplo 3: Procesamiento continuo de proteína terapéutica (mAb A)

Estudio de tiempo de residencia 1:

- 10 Dado que el anterior ciclo de cromatografía se realizó con un tiempo de contacto de aproximadamente 25 min en la columna 1, se realizaron algunos ciclos más para evaluar el tiempo de contacto mínimo que se debe dar con el fin de obtener una reducción óptima de la heterogeneidad de la proteína terapéutica.

- 15 El ciclo cromatográfico se realizó utilizando una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (columna 1, CV = 10 ml), seguida por una columna de Proteína A (MabSelect SuRe™ pcc) (columna 2, CV = 1 ml) (CPB- PA en serie) en modo continuo (FIGURA 4). El procedimiento se llevó a cabo en el Sistema de Cromatografía de Procedimiento AKTA Avant 150, GE Healthcare, con líquido de cultivo celular clarificado con proteína Terapéutica (mAb A) (aproximadamente 40 mg) con un caudal de 0,5 ml/min, manteniendo un tiempo de residencia de 20 min en la Columna 1 y 2 min en la Columna 2, respectivamente. El sistema AKTA Avant se puede sustituir por el sistema AKTA PCC.

La FIGURA 4 muestra una configuración de procesamiento continuo de la Columna 1 y la Columna 2 cuando funcionan con caudales iguales.

- 20 La muestra neutralizada (Elución de CPB-PA) se presentó para análisis WCEX junto con el control (solo elución de Proteína A sin CPB) (FIGURA 5).

La FIGURA 5 muestra un perfil de cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR, seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con 20 min de TR.

- 25 La elución de CPB-PA mostró digestión/eliminación de variantes básicas en mAb A en comparación con el control, tal como se muestra en los datos comparativos del análisis WCEX (FIGURA 6).

La FIGURA 6 muestra una superposición de datos de Análisis WCEX para Control y Elución de CPB-PA. Este experimento concluyó que el CPB en la columna mostraba la actividad o escisión/digestión de la variante básica con 20 min de TR.

Estudio de tiempo de residencia 2:

- 30 Para evaluar el tiempo de residencia (TR) mínimo en la columna, el caudal se cambió de 0,5 ml/min a 10 ml/min en la columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1), manteniendo un TR de 2 min, mientras que el caudal en la columna de Proteína A (columna 2) fue de 0,5 ml/min, manteniendo un TR de 2 min. En este caso se recogió el flujo continuo de la columna 1 y luego se volvió a cargar en la columna 2 en modo continuo para mantener diferentes TR y caudales, ya que los volúmenes de la columna son diferentes (FIGURA 7).

- 35 La FIGURA 7 muestra una configuración de procesamiento continuo de la Columna 1 y la Columna 2 cuando funcionan con caudales diferentes. La muestra neutralizada (Elución de CPB-PA con 2 min de TR) se presentó para análisis WCEX junto con el control (solo elución de Proteína A sin CPB) y con la Elución de CPB-PA con 20 min de TR (FIGURA 8).

- 40 La FIGURA 8 muestra un Perfil de Cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo con 2 min de TR.

La elución de CPB-PA mostró digestión/eliminación de variantes básicas en mAb A en comparación con el control con 2 min de TR así como en la Columna 1, tal como se muestra en los datos comparativos del análisis WCEX (FIGURA 9).

- 45 La FIGURA 9 muestra una superposición de datos de Análisis WCEX para Control y Elución de CPB-PA con 2 min de TR.

Comparación de reducción con dos TR diferentes

Con un tiempo de residencia de 2 min en la columna 1, la digestión fue significativamente comparable a la de 20 min de TR en la columna 1 (FIGURA 10). La FIGURA 10 muestra una superposición de datos de Análisis WCEX para Elución de CPB-PA con 20 min de TR y 2 min de TR, respectivamente, en la Columna 1 para mAb A. Por lo tanto, los

ciclos de cromatografía también se pueden operar sucesivamente con un tiempo de residencia de 2 min. También se puede evaluar un tiempo de residencia inferior a 2 min.

Ejemplo 4: Procedimiento para reducir isoformas básicas en mAb B

La carboxipeptidasa B actúa preferentemente sobre los aminoácidos básicos, como la arginina y la lisina. Por lo tanto, la resina se puede utilizar para eliminar isoformas cargadas que pertenecen a cualquier clase de IgG o anticuerpos monoclonales. La eliminación de dichas isoformas cargadas en la propia primera etapa en modo continuo puede dar como resultado un producto de alta calidad, pureza y alta recuperación. Otro modelo de mAb evaluado para la eliminación de isoformas cargadas/variantes básicas usando la columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR, seguida por una columna de Proteína A en modo continuo con 2 min de TR, consistió en el mAb B (FIGURA 11).

La FIGURA 11 muestra un Perfil de Cromatograma de una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb B en modo continuo con 2 min de TR.

La elución de CPB-PA mostró digestión/eliminación de variantes básicas en mAb B en comparación con el control (elución solo de Proteína A neutralizada, sin columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR), tal como se muestra en los datos comparativos del análisis WCEX (FIGURA 12). Por lo tanto, se puede concluir que esta estrategia es aplicable para cualquier anticuerpo monoclonal perteneciente a todas las clases de IgG para la eliminación de variantes de carga básicas.

Ejemplo 5: Procedimiento para reducir isoformas básicas en mAb A con diferentes densidades de carga en tres columnas

Para evaluar la capacidad de carga máxima en la columna Sepharose™ 4B activada con CPB-CNBR se evaluaron diferentes densidades de carga en modo continuo utilizando líquido de cultivo celular clarificado con mAb A, tal como se menciona en la Tabla nº 1. Los ciclos cromatográficos se realizaron utilizando una columna Sepharose™ 4B activada por CNBR en casa (Columna 1), seguida por una columna de Proteína A (MabSelect SuRe LX) (columna 2) (CPB-PA en serie) en modo continuo. El procedimiento se llevó a cabo en ÄKTA pcc (cromatografía en Contracorriente Periódica en tres columnas, 3C PCC), GE Healthcare, con líquido de cultivo celular clarificado con mAb A procedente de cultivo de perfusión con un caudal de 5 ml/min cuando una columna Sepharose™ 4B activada con CPB-CNBR (Columna 1) y dos columnas de Proteína A (Columna 2) están conectadas en paralelo. El tiempo de residencia mantenido en la Columna 1 es equivalente a 1,7 min, que era menor que en estudios anteriores, y en la columna 2 fue de aproximadamente 4,4 min (ya que la resina utilizada es MabSelect SuRe LX).

Tabla nº 1: Los detalles de carga en la Columna 1 y la Columna 2

Sr. nº	Volumen de carga (ml)	Proteína total (mg)	Volumen de columna de la Columna 1 (ml)	Densidad de carga en la Columna 1 (mg/ml)	Volumen de columna de la Columna 2 (ml)	Densidad de carga en la Columna 2 (mg/ml)	Tiempo para la carga (min)
1*	30	40	10	4	1	40,0	80
2 ^π	60	85	NA	NA	22	4	12
3	60	85	8,5	10	22	4	12
4	120	170	8,5	20	22	8	24
5	240	341	8,5	40	22	15	48
6	480	682	8,5	80	22	31	96

* El ciclo cromatográfico según las condiciones mencionadas en Sr. nº 1 se realizó con anterioridad (FIGURA 5).

^π Procesamiento de Control

Se realizó un procesamiento de control usando solo la columna de proteína A para la comparación del análisis WCEX tal como se menciona en la Tabla 1. El ciclo de cromatografía según las condiciones mencionadas en Sr. nº 3, 4, 5 y 6, en donde la densidad de carga en la Columna 1 fue de 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml y 80 mg/ml, respectivamente, se llevó a cabo de forma continua. En este ciclo de cromatografía, una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1) y dos columnas de Proteína A (Columna 2) se conectaron en paralelo y la Columna 1 y la columna 2 se procesaron en serie (FIGURA 13 y FIGURA 14 para perfil de cromatograma). Las muestras neutralizadas se entregaron para análisis WCEX con el fin de compararlas con el control.

La FIGURA 13 muestra un Perfil de Cromatograma de una columna de Proteína A procesada para mAb A como control en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 14 muestra un Perfil de Cromatograma para una densidad de carga de 10 mg/ml, 20 mg/ml y 40 mg/ml, respectivamente, en una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1) seguida por una columna de Proteína A para mAb A en modo continuo en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 15 muestra un Perfil de Cromatograma para una densidad de carga de 80 mg/ml en una columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR (Columna 1) seguida por una columna de Proteína A procesada para mAb A en modo continuo en ÄKTA pcc (3C pcc).

La FIGURA 16 muestra superposiciones de datos de Análisis WCEX de Elución de CPB-PA neutralizada para densidad de carga individual con el Control. Como se observa en la FIGURA 16, la resina mostraba actividad o disminución en las isoformas de cargas básicas en comparación con el control. Por lo tanto, esta resina también puede funcionar más allá de 80 mg/ml de densidad de carga en la columna 1, en donde, si el volumen de la columna de resina de Proteína A también permanece igual que la columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR, se requerirán 2 columnas de Proteína A en paralelo para que la cantidad de salida sea suficiente con respecto a la de una columna 1.

La FIGURA 17 muestra superposiciones de datos de Análisis WCEX de Elución de CPB-PA junto con control con diferentes densidades de carga en la Columna 1 para mAb A. Al comparar las superposiciones de datos de análisis WCEX con todas las densidades de carga diferentes se observó que, aunque se produjo una disminución en las isoformas cargadas básicas en todas las muestras, en el caso de 80 mg/ml de densidad de carga en la columna 1 (FIGURA 17) se observó un ligero aumento de las variantes ácidas. Esto se puede deber a la mayor densidad de carga, es decir, una mayor proporción de proteína:CPB, o a un mayor tiempo de carga. No obstante, dado que el tiempo de residencia fue igual en todos los procesamientos, 1,7 min, y también un dato comparativo con la condición 1 mencionada en la Tabla 1, donde el tiempo de carga fue de 80 min en la columna 1, no se produjo ningún aumento de las isoformas ácidas (FIGURA 5). Por lo tanto, la razón probable puede consistir en la proteína total cargada en la columna 1 cuando avanza (modo de flujo continuo) a la columna 2, puede haber un aumento gradual de las variantes ácidas con el tiempo y la cantidad de proteína cargada, y se acumulan en la Columna 2 (modo de unión y elución), la proteína total eluida contiene el aumento de las formas ácidas. Por lo tanto, será mejor regenerar la columna 1 con tampones de pH no inferior a pH 3,0 que comprenden acetato de Sodio 50 mM, pH 5,0, u otros tampones similares, entre los procesamientos donde se obtiene la calidad y la cantidad requeridas.

Ejemplo 6: Procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de proteína terapéutica (mAb A) en 4 columnas en una operación unitaria

Los ciclos cromatográficos se llevaron a cabo en modo continuo con 4 columnas en paralelo que funcionaban en serie en ÄKTA pcc (cromatografía en Contracorriente Periódica de tres columnas, 4C PCC), GE Healthcare, con líquido de cultivo celular clarificado con mAb A procedente de cultivo de perfusión con un caudal de 5 ml/min (FIGURA 18 y FIGURA 19). La columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR en casa (Columna 1) fue seguida por la columna de Proteína A (MabSelect SuRe LX) (columna 2), seguida por inactivación Viral y Cromatografía de Intercambio Aniónico (Q Sepharose Fast Flow) (Columna 3) y éstas seguidas por cromatografía de Intercambio Catiónico (SP Sepharose Fast Flow) (Columna 4) en modo continuo. También se pueden incorporar el procedimiento del esquema arriba mostrado y otras técnicas de cromatografía y química de resinas, como cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de modo Mixto sobre la base de los requisitos de calidad, pureza y productividad o recuperación. La secuencia de la etapa de cromatografía también se puede cambiar en función de los requisitos.

La FIGURA 18 muestra una configuración de ÄKTA pcc (4C PCC) para el Procesamiento Continuo de mAb A.

A continuación se ilustra el tampón utilizado en cada columna. Las otras combinaciones de tampones también se pueden usar en el mismo intervalo de pH y conductividad para obtener la calidad y productividad deseadas.

1) Columna 1: volumen de la columna = 8,5 ml, densidad de carga = 60 mg/ml.

Equilibrio y lavado posterior a la carga: Trisi HCl 50 mM, pH 7,0 ± 0,2, conductividad 4,0 ± 1,0 mS/cm.

Regeneración: acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 ± 0,2, conductividad 3,6 ± 1,0 mS/cm.

2) Columna 2: volumen de la columna = 22 ml, densidad de carga = 23 mg/ml.

Equilibrio y lavado posterior a la carga: Trisi HCl 50 mM, pH 7,0 ± 0,2, conductividad 4,0 ± 1,0 mS/cm.

Elución: ácido acético 100 mM, pH 3,0 ± 0,2.

Regeneración: hidróxido de sodio 500 mM.

3) Columna 3: volumen de la columna = 20 ml, densidad de carga = 25 mg/ml.

Equilibrio y lavado posterior a la carga: Tris HCl 50 mM, pH 7,0 $\pm$ 0,2, conductividad 4,0 $\pm$ 1,0 mS/cm.

Regeneración: hidróxido de sodio 500 mM.

- 4) Columna 4: volumen de la columna = 20 ml, densidad de carga = 25 mg/ml.

Equilibrio y lavado posterior a la carga: acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 $\pm$ 0,2, conductividad 3,6 $\pm$ 1,0 mS/cm.

Elución: acetato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0, conductividad 15,0 $\pm$ 1,0 mS/cm.

Regeneración: hidróxido de sodio 500 mM.

En este procedimiento continuo, la Columna 1 se cargó con la densidad de carga de 60 mg/ml en una columna CV de 8,5 ml y el flujo continuo se pasó de forma continua por la Columna 2 para la captura de mAb A. La proteína unida se eluyó con ácido acético 100 mM con un volumen de CV tal que el pH de elución fuera equivalente al pH requerido para la inactivación viral. La inactivación viral se llevó a cabo a pH $\leq$ 3,6, se mantuvo durante 1 hora y después se llevó a cabo la neutralización de la elución de Proteína A mediante adición en línea del volumen requerido de Base Tris 2M. El pH y la conductividad de la elución de proteína A neutralizada eran equivalentes a los requeridos para la carga en la columna 3 que exige la retirada de HCP, HcDNA y virus de la misma, pH 7,0 $\pm$ 0,2, y la conductividad era menor de 10 mS/cm, y se comprobó que era de aproximadamente 4,5 $\pm$ 1,0 mS/cm. Esta elución de proteína A neutralizada se pasó a la columna 3 previamente equilibrada, operada en modo de flujo continuo, y se recogió el flujo continuo de la misma. Dado que la columna 4 iba a ser operada en modo de unión y elución a pH 5,0 y conductividad $\leq$ 6,0 mS/cm (pero sin limitarse únicamente a estas condiciones), de nuevo se llevó a cabo una adición en línea de la cantidad requerida de ácido, en este caso ácido acético 100 mM, como etapa de preparación de carga para la carga de la columna 4. Se comprobó que el pH de la carga era de 5,0 $\pm$ 0,2 y la conductividad era $<$ 3,5 mS/cm, y se cargó en la columna 4, y la proteína unida se eluyó con acetato de Sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0, Conductividad 15,0 $\pm$ 1,0 mS/cm y se presentaron muestras para análisis WCEX con el fin de compararlas en la eliminación de isoformas de carga. Se realizó la regeneración de todas las columnas y la preparación para el siguiente ciclo. En las FIGURAS 18 y 19 se muestran el perfil de cromatograma y los datos analíticos, respectivamente.

La FIGURA 19 muestra un perfil de Cromatograma para el Procesamiento Continuo de mAb A en ÄKTA pcc (4C PCC). Si se requiere la eliminación de otras impurezas relacionadas con el producto, se pueden modificar las condiciones del procedimiento de la columna 4 para gradiente lineal o escalonado u otros modos de interacciones. Los parámetros de este procedimiento se pueden modificar dependiendo de factores como la naturaleza de la proteína terapéutica, el punto isoeléctrico, la calidad, la pureza y la productividad, la rentabilidad y la facilidad de operación.

Tanto las muestras de elución de la Columna 2 (muestra de elución de proteína A neutralizada) como las muestras de elución de la Columna 4 se entregaron para análisis WCEX junto con la muestra de control perteneciente al experimento de densidad de carga (FIGURA 20).

La FIGURA 20 muestra un control de superposiciones de datos de Análisis WCEX con Elución de Columna 2 y Elución de Columna 4 del procesamiento continuo. La Columna 2 y la Columna 4 muestran el mismo perfil WCEX y muestran la eliminación de isoformas básicas, en donde con esta densidad de carga (60 mg/ml) no existe el aumento de las variantes ácidas que se observó con una densidad de carga de 80 mg/ml. Por lo tanto, las condiciones de operación óptimas para esta columna Sepharose™ 4B activada por CPB-CNBR en casa pueden comprender una densidad de carga de $\leq$ 80 mg/ml, para un tiempo de carga de aproximadamente 1-2 h para mAb A, y un TR de $\geq$ 1,7 min, después de lo cual se puede incorporar la regeneración entre los ciclos para obtener resultados coherentes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, comprendiendo el procedimiento reducir una o más isoformas básicas de la proteína terapéutica en un sistema de cromatografía de múltiples columnas individual, en donde el sistema de cromatografía de múltiples columnas individual comprende al menos dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas interconectadas o conmutadas que realizan en cada caso una operación unitaria diferente, en el que el sistema de cromatografía de múltiples columnas individual incluye una columna que comprende carboxipeptidasa B inmovilizada en sefarosa.
2. Un procedimiento continuo para reducir la heterogeneidad de una proteína terapéutica, comprendiendo el procedimiento las etapas consistentes en:
 - (a) proporcionar un sistema de cromatografía de múltiples columnas que comprende una primera columna, una segunda columna, una tercera columna y una cuarta columna;
 - (b) introducir una cosecha de cultivo celular que comprende una proteína terapéutica en la primera columna, con lo que se reduce la heterogeneidad de la proteína terapéutica; comprendiendo la primera columna carboxipeptidasa B inmovilizada en sefarosa;
 - (c) introducir un flujo continuo procedente de la primera columna en la segunda columna, con lo que se captura la proteína terapéutica en el flujo continuo de la primera columna;
 - (d) introducir un eluato que comprende la proteína terapéutica procedente de la segunda columna en la tercera columna para purificar la proteína terapéutica; e
 - (e) introducir un flujo continuo que comprende la proteína terapéutica procedente de la tercera columna en la cuarta columna para pulir la proteína terapéutica.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende recoger el eluato que incluye la proteína terapéutica procedente de la segunda columna, y mantener el eluato que incluye la proteína terapéutica a un pH bajo para la inactivación viral.
4. El procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende someter el eluato que incluye la proteína terapéutica procedente de la segunda columna a ajustes de pH y conductividad antes de introducirlo en la tercera columna.
5. El procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende someter el someter el flujo continuo que comprende la proteína terapéutica procedente de la tercera columna a ajustes de pH y conductividad antes de introducirlo en la cuarta columna.
6. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la primera, segunda, tercera y cuarta columnas están conectadas en orden secuencial en serie o en paralelo.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera columna reduce la heterogeneidad de la proteína terapéutica mediante la reducción de una proporción de isoformas básicas de la proteína terapéutica.
8. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la segunda columna es una columna de cromatografía de afinidad.
9. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la tercera columna y la cuarta columna se seleccionan en cada caso entre el grupo que consiste en una columna de cromatografía de intercambio aniónico, una columna de cromatografía de intercambio catiónico, una columna de cromatografía de interacción hidrófoba y una columna de cromatografía multimodal.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína terapéutica se selecciona entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, una enzima, una proteína modificada por ingeniería genética, una proteína inmunógena, un fragmento de proteína, una inmunoglobulina o cualquier combinación de los mismos.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína terapéutica se selecciona entre el grupo consistente en panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, amatuximab, anatumomab, anrukizumab, apolizumab, arcitumomab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, besilesomab, bezlotoxumab, biciromab, blinatumomab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, cixutumumab, daclizumab, denosumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, figitumumab, golimumab, ibritumomab tiuxetán, igovomab, imgatuzumab, infliximab, inolimomab, inotuzumab, labetuzumab, lebrikizumab, moxetumomab, natalizumab, nivolumab, obinutuzumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab,

ramucirumab, ranibizumab, rituximab, Secukinumab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, tucotuzumab, trastuzumab, Ustekinumab, vedolizumab, veltuzumab, zalutumumab, zatuximab, enzimas, proteínas, proteínas inmunógenas o antigénicas o fragmentos de proteína, alglucosidasa alfa, laronidasa, abatacept, galsulfasa, lutropina alfa, factor antihemofílico, agalsidasa beta, interferón beta-1a, darbepoetina alfa, tenecteplasa, etanercept, factor de coagulación IX, hormona estimuladora del folículo, interferón beta-1a, imiglucerasa, dornasa alfa, epoetina alfa, insulina o análogos de insulina, mecasermina, factor VIII, factor VIIa, antitrombina III, proteína C, albúmina humana, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos, interleucina-11, laronidasa, idursufasa, galsulfasa, inhibidor de α -1-proteinasa, lactasa, adenosina desaminasa, activador del plasminógeno tisular, tirotropina alfa, β -galactosidasa ácida, β -galactosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa A y hexosaminidasa B.

12. El procedimiento según la reivindicación 2, que además comprende formular la proteína terapéutica pulida en una composición farmacéutica.

13. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el sistema de cromatografía de múltiples columnas se opera en un modo continuo.

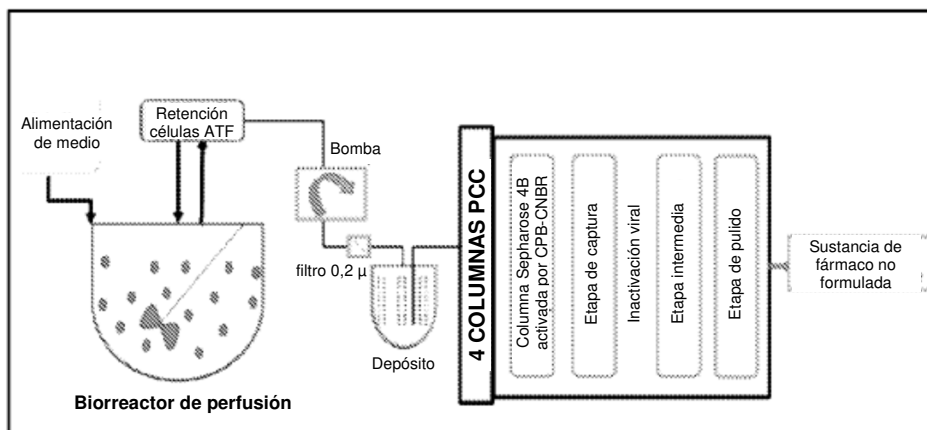


FIG. 1

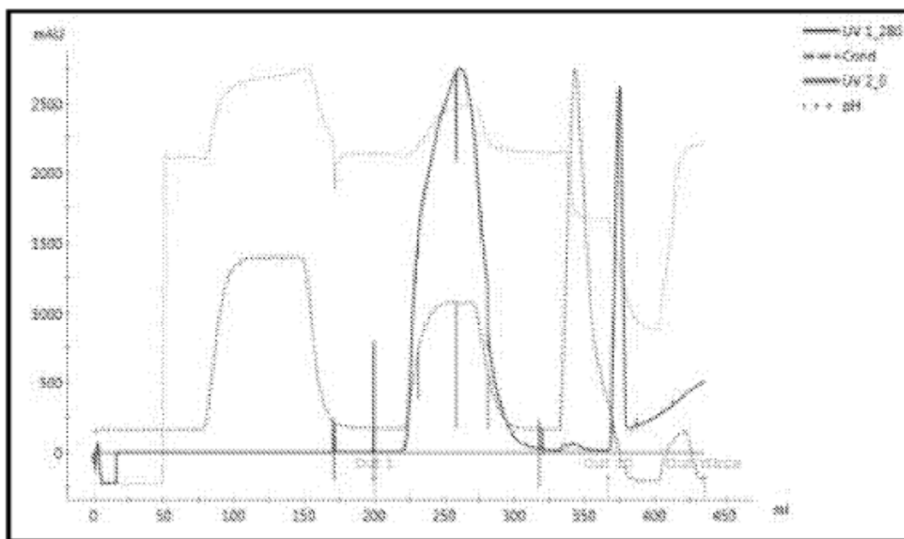


FIG. 2

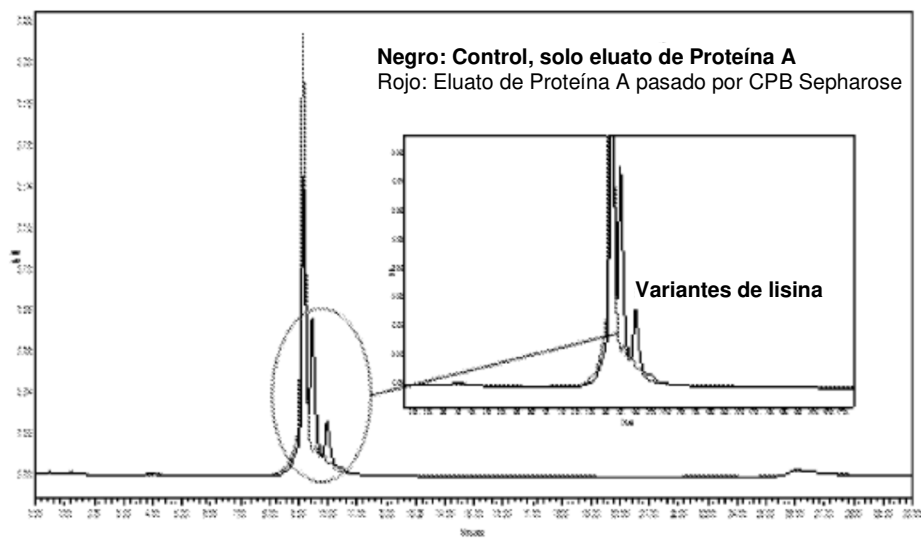


FIG. 3

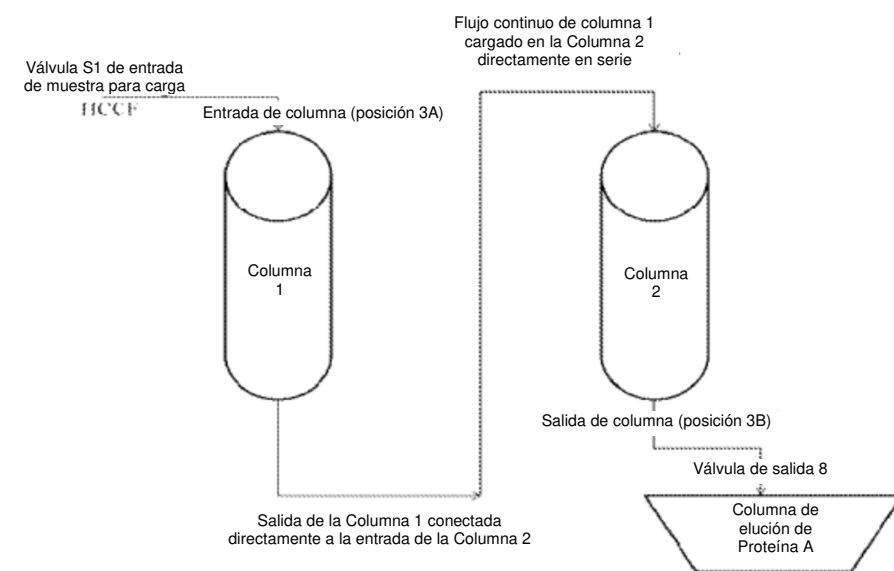


FIG. 4

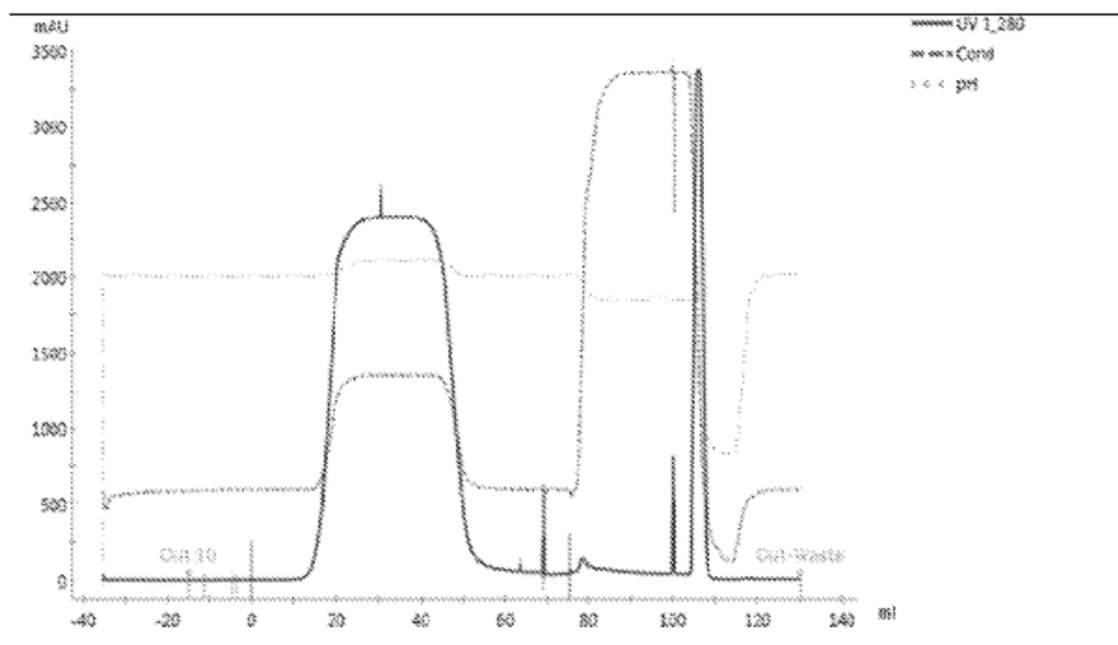


FIG. 5

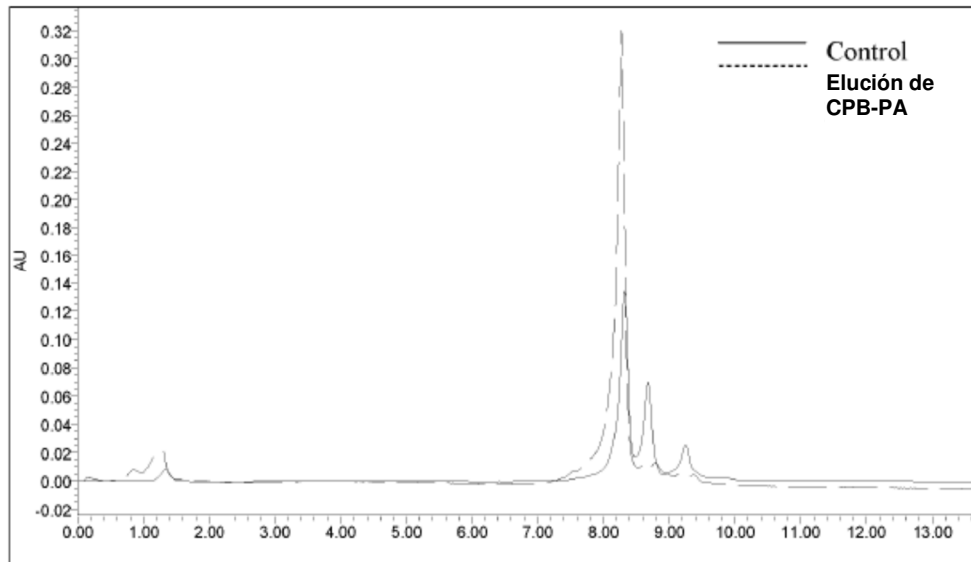


FIG. 6

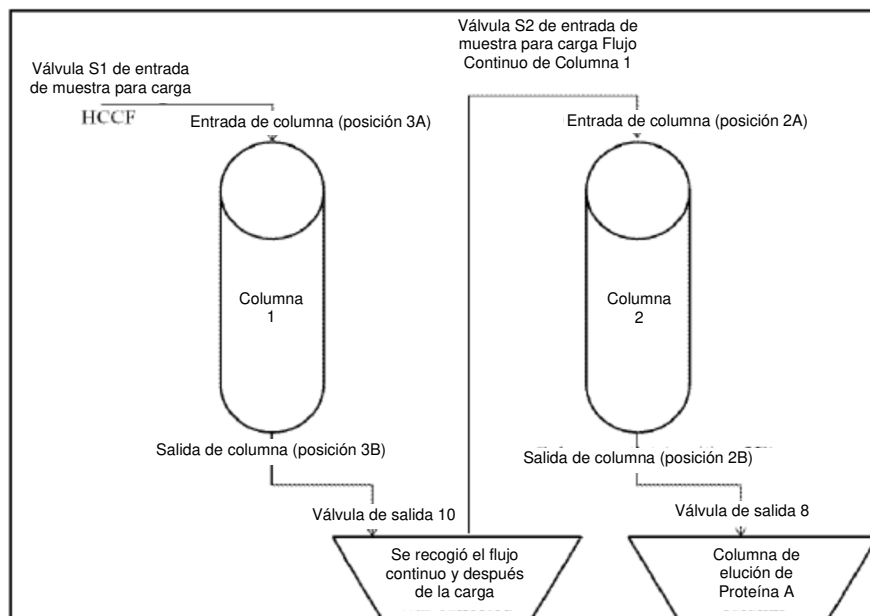


FIG. 7

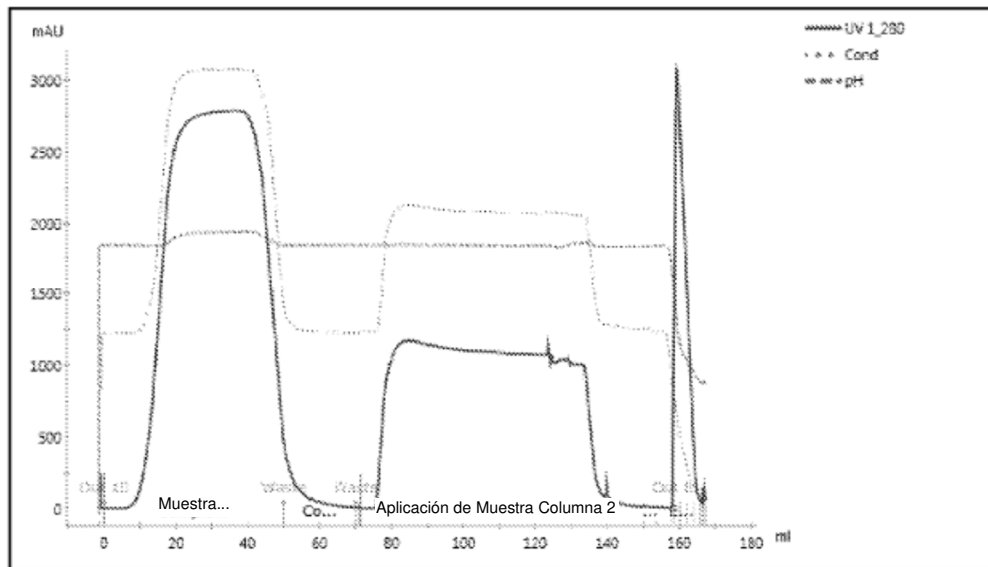


FIG. 8

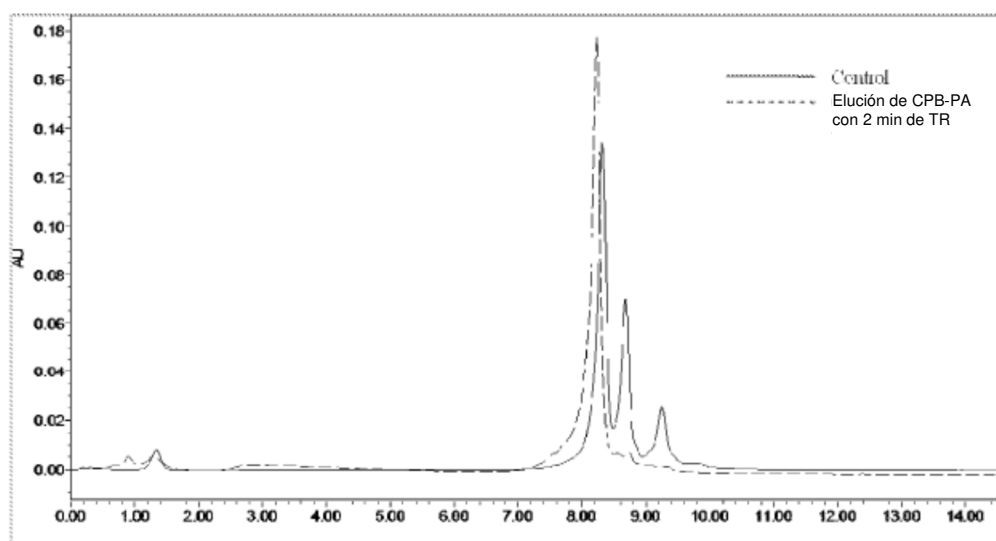


FIG. 9

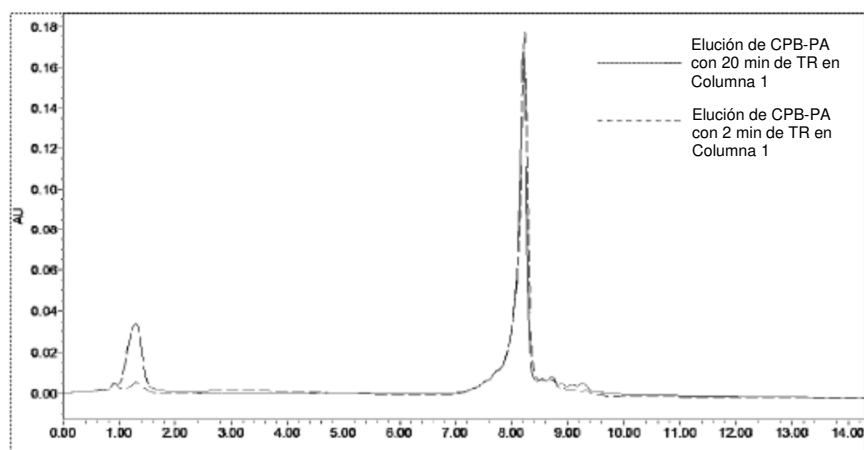


FIG. 10

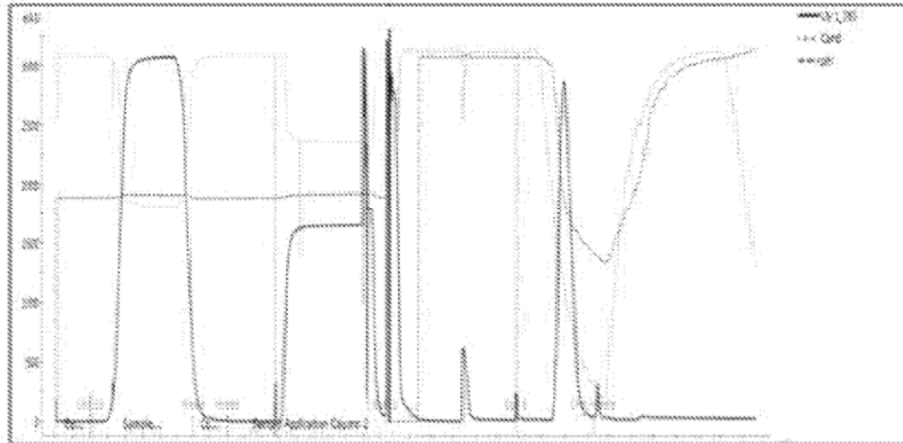


FIG. 11

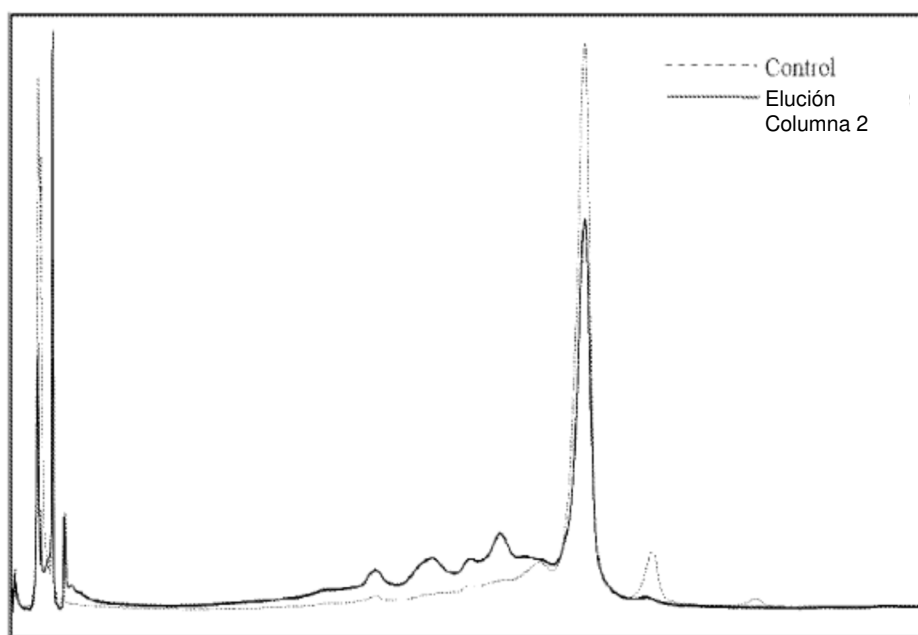


FIG. 12

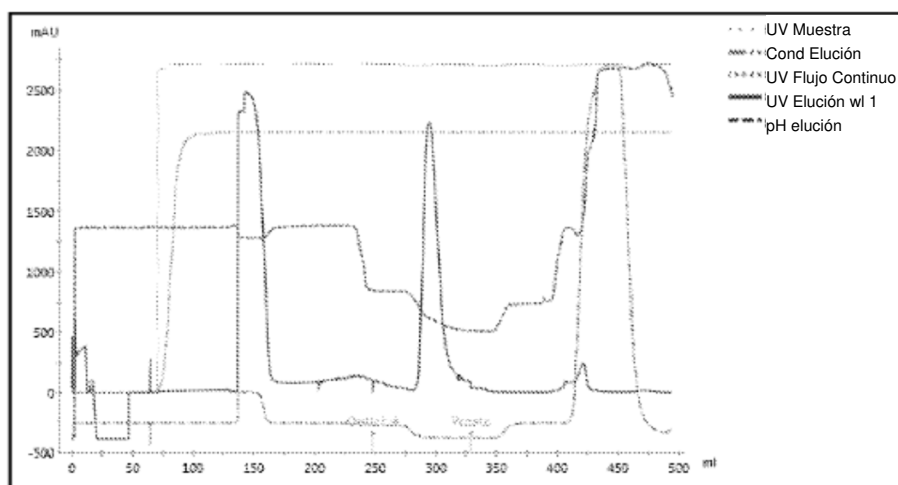


FIG. 13

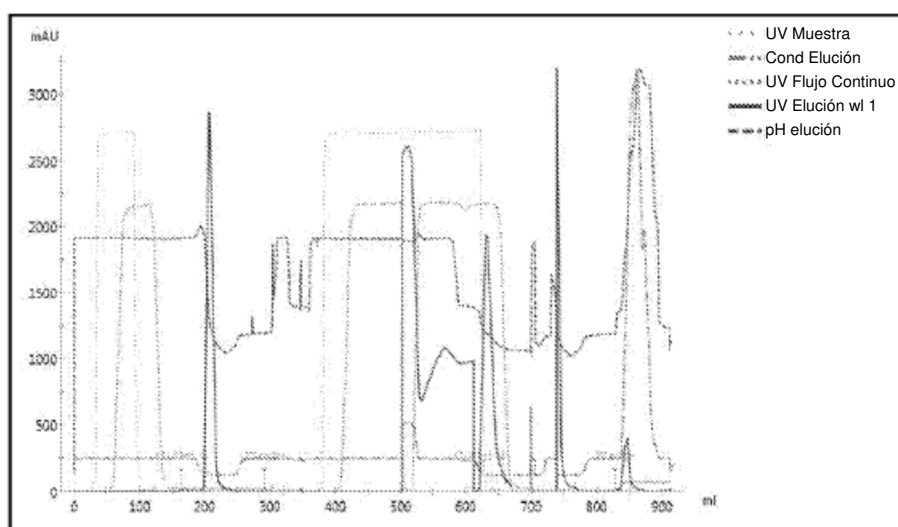


FIG. 14

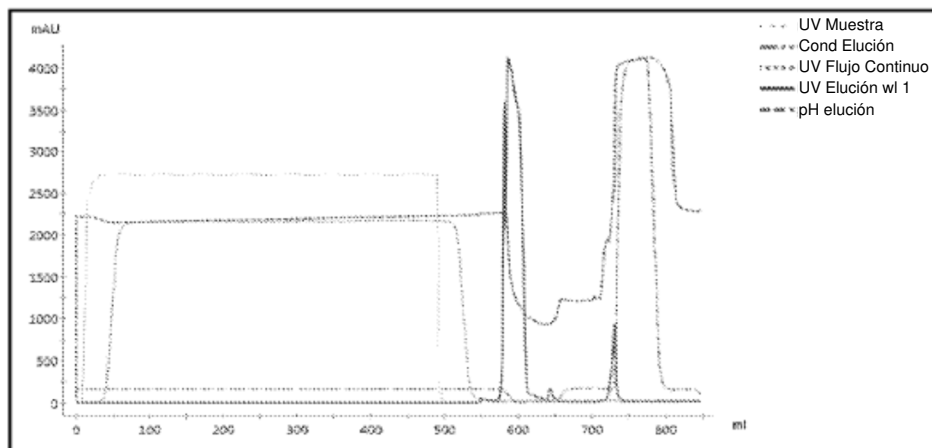


FIG. 15

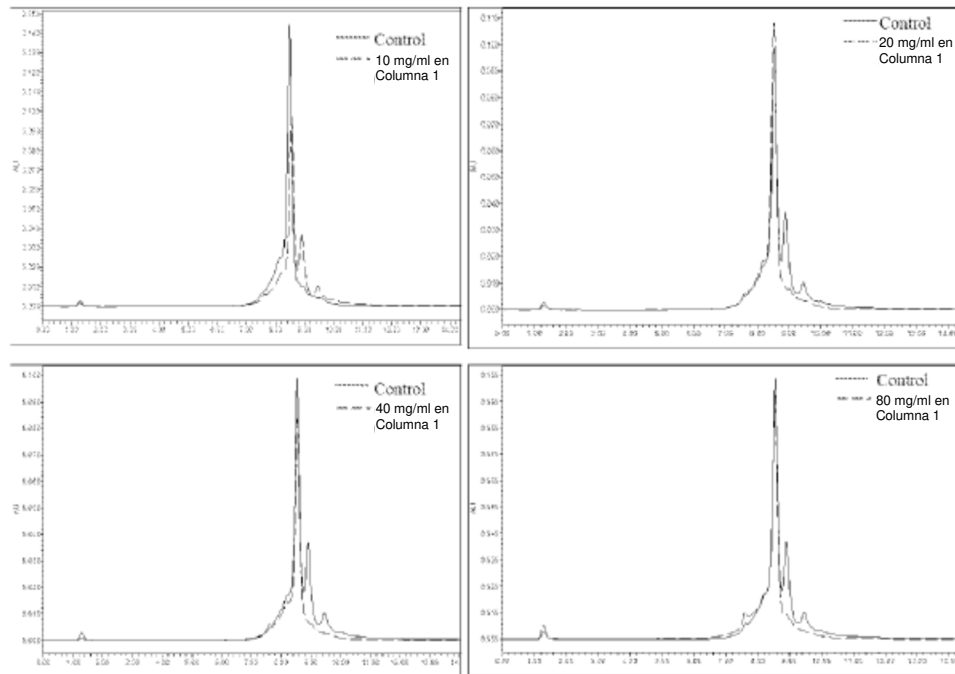


FIG. 16

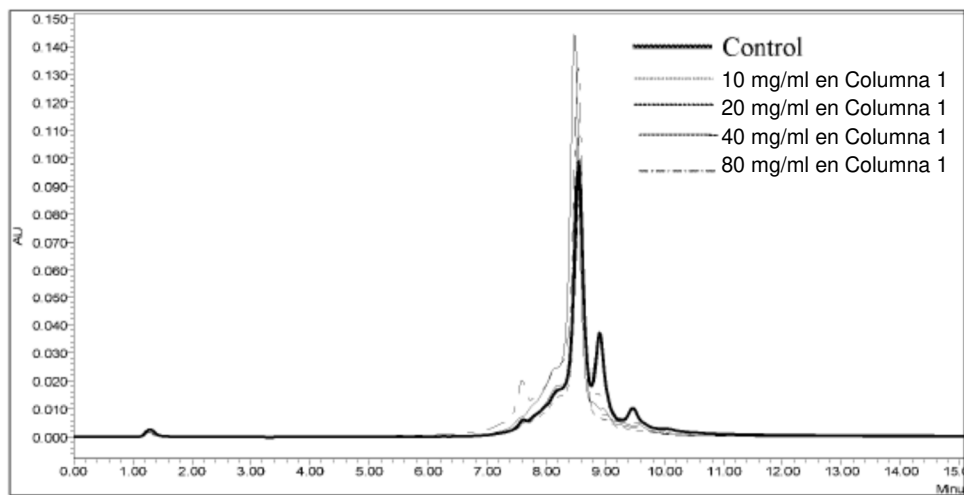


FIG. 17

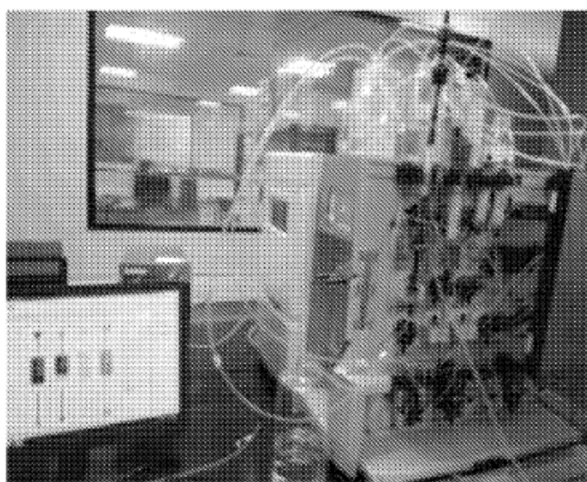


FIG. 18

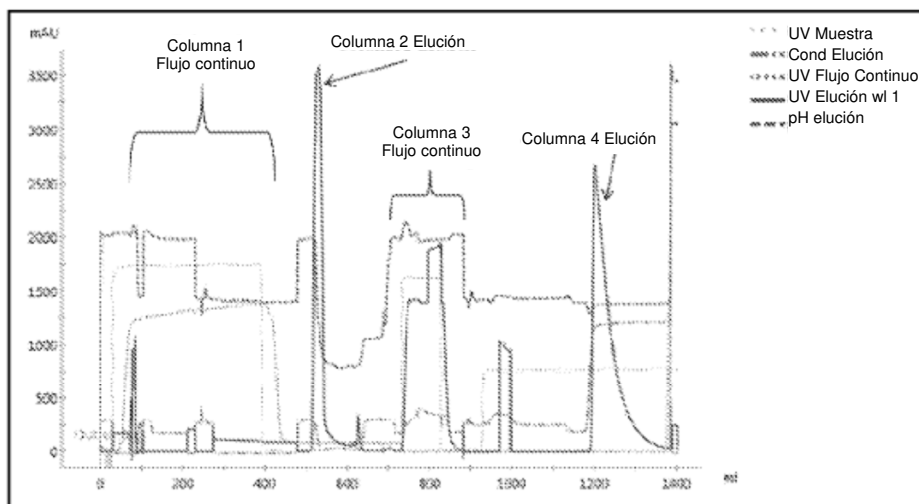


FIG. 19

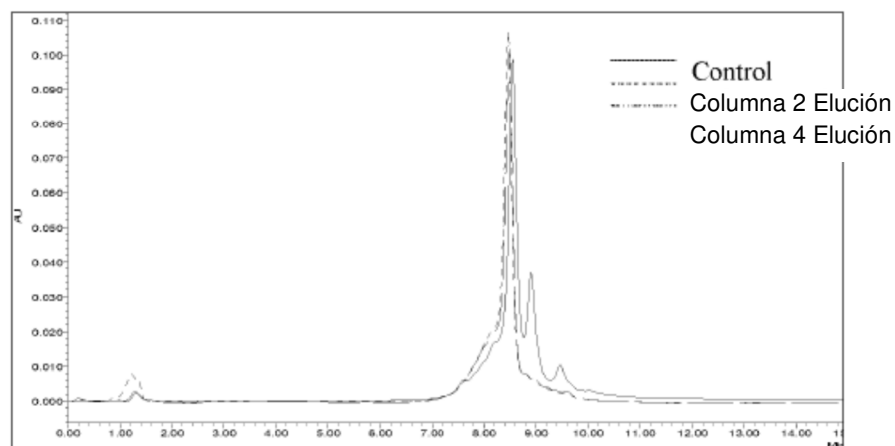


FIG. 20