

Q.F.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

06-48228

54. TÍTULO "ELIMINACION DE AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA DE HIDROXIAPATITA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/06

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO MADISON, ESTADO DE NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 19 MAY 2006

Creación
en 22-05-2006
Completado 14 folios
09-03-2006

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-048228- -00000-0000
Fec: 2008-05-10 17:03:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTE/VI
Eve: 378 FABENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 119

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

27-05-06

① **SOLICITUD DE:**
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

② **SOLICITANTE (71)**

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, Estado de New Jersey 07940, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 **Fax:** 6069701
E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③ **REPRESENTANTE APODERADO**

Nombre: ALICIA LLOREDICA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 **Fax:** 6069701
E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 TP 53.215

④ **INVENTOR(ES) (72)**

Nombre: SUN, Shujun; GALLO, Christopher y KELLEY, Brian.

Dirección: 43 Peabody Drive, Brentwood, NH 03833; 9 Karen Road, Windham, NH 03087 y 108 Blakely Road, Medford, MA 02155.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤ **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/032883 **Fecha:** 06/10/04

Publicación Internacional No. WO 2005/044856 A2 **Fecha:** 19/05/05

⑥ **Título (54)** "ELIMINACIÓN DE AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CROMATOGRFIA DE HIDROXIAPATITA"

⑦ **Clasificación Internacional (51)** C07K 16/06, B01D 15/08

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	27/10/03	60/514,018
	US	20/11/03	60/523,335

⑨ **Comprobante de Pago No.** 06-33,890 **Fecha:** 5 de Mayo de 2008

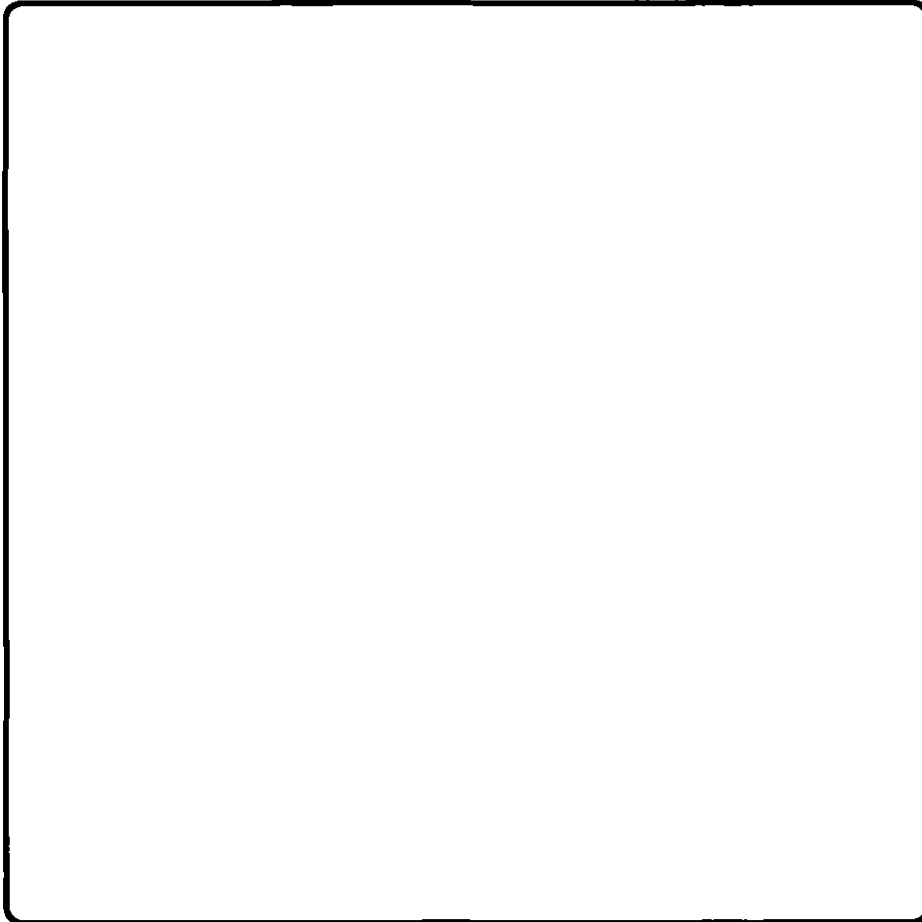
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción y dibujos.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.690.713 Usaquén, T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-048228- -00000-0000
Fec: 2006-05-10 17:03:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tia: 11 PATENTE/IN
Evr: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 119

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 33,690
FECHA : MAYO 5 DE 2006

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47044958	05/05/2006	4,630,000.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL 1	463,000.

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

✓

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-11-09-582
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

Marilyn L. Mitchell
Notario Público, Estado de New Jersey
Mi Comisión Expira el 6 de febrero de 2005

NOTARIO PUBLICO
ESTADO DE NEW JERSEY
MILLYN L MITCHELL
COMISION EXPIRA EL 6 DE FEBRERO DE 2005

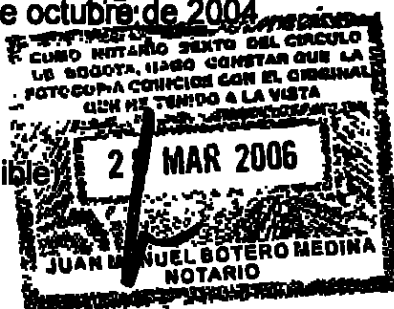
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Marilyn L. Mitchell.
3. actuando como Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello/estampilla de Marilyn L. Mitchell, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, New Jersey
 6. el día 7 de octubre de 2004
 7. por John E McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
 8. No. A210247
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (ilegible)
- Hay un sello dorado.



Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de noviembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

*

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

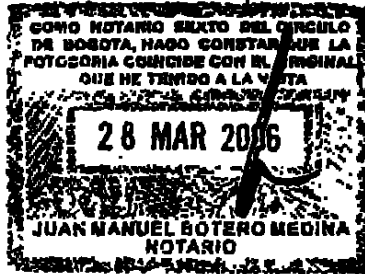
283161
Anita Escobar

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 NOV 10 P 10:40

UCB
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



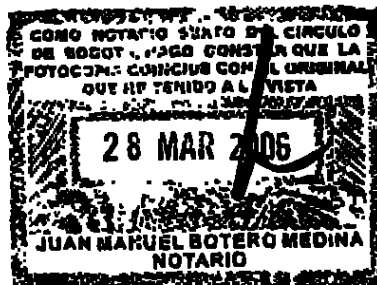
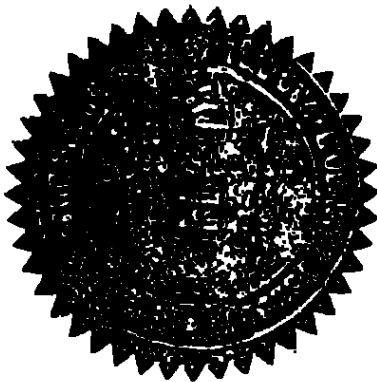
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 7TH DAY OF OCTOBER 2004
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A210247
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

Los abajo firmados, WYETH, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

con domicilio en Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, perdir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

6
The undersigned, WYETH, a corporation organized and existing under the laws of State of Delaware, United States of America.

domiciled at Five Giralda Farms, Madison,
State of New Jersey 07940,
United States of America

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all instalments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for the purpose of the foregoing.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this: 6th day of October 2004
Wyeth


William H. Calnan
Assistant Secretary

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de New Jersey {ss
Condado de Morris

Hoy 6 de Octubre de 2004 compareció
William H. Calnan, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es

de WYETH la compañía nombrada en el documento
que antecede, una sociedad debidamente organizada
y existente conforme a las leyes del Estado de
Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada
en la ciudad de Madison, Condado de Morris,
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América,
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social;
conforme a las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América; que el declarante está
autorizado por dicha Compañía para conferir este
poder, que el sello estampado por él al pie de tal
poder, en nombre y en representación de la
expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que
el objeto para el cual se confiere este Instrumento
está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
Incorporación firmados en Madison, Estado de New
Jersey, con fecha 4 Febrero, 1926, y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).



NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of New Jersey {ss
County of Morris

On this 6th day of October 2004, personally
came, William H. Calnan
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing Instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the
Assistant Secretary of WYETH the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of State of Delaware, United States of
America, domiciled at the City of Madison, County of
Morris, State of New Jersey, United States of
America, legally constituted for a period of tenure not
yet expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of State of Delaware, United
States of America; that the deponent is authorized by
said Company to confer this power of attorney; that
the seal affixed hereunto by the deponent in the
name and on behalf of said Corporation is the
corporate seal thereof; and that the purpose for which
this Instrument is granted is included within the
corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Wilmington, Delaware U.S.A. under date of
February 4, 1926, and hereby certifies that under the
laws of said State the foregoing acknowledgment is
sufficient proof that the facts therein contained are
true, which he attests.

Marilyn L. Mitchell

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 8, 2005

7

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 8702.146-304	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US2004/032883	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 06/10/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 27/10/2003
Solicitante WYETH		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 3 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ La búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☐ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/032883

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO
IPC 7 C07K16/06 B01D15/08

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GIOVANNINI ROBERTO Y COL: "Separación de un anticuerpo recombinante del supernadante de un cultivo celular: Cromatografía continua anular versus cromatografía discontinua y cromatografía de lecho expandido" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 73, no.6, 20 de Junio de 2001 (2001-06-20), páginas 522-529, XP002327112 ISSN: 0006-3592 citado en la solicitud resumen página 524, columna a mano izquierda, párrafo 2 - página 525, columna a mano derecha, párrafo 1 figura 3 --- -/-	1-6, 8-21, 23-36, 38-52, 55-69, 74-86, 91-103, 108-117

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. * Categorías especiales de documentos citados:		☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.	
'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada		'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica 'Z' documento miembro de la misma familia de patentes	
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 4 de Mayo de 2005		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 23/05/2005	
Nombre y dirección de correo de la ISA Oficina de Patentes Europea, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Ulbrecht, M	

Handwritten mark

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/US2004/032883

9

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GIOVANNINI R Y COL: "Comparación de diferentes tipos de hidroxipatita cerámica para la separación cromatográfica de DNA plasmido y un anticuerpo D recombinante anti-rhesus" BIOSEPARATION. 2000, vol. 9, no. 6, 2000, páginas 359-368, XP009047265 ISSN: 0923-179X página 365, columna a mano derecha, párrafo 2 figura 5	1-6, 8-21, 23-36, 38-52, 55-69, 74-86, 91-103, 108-117
A	TARDITI L Y COL: "Purificación de anticuerpos monoclonales biespecíficos por cromatografía líquida de alta eficiencia selectiva" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 599, 1992, páginas 13-20, XP002981686 ISSN: 0021-9673 citado en la solicitud página 15, columna a mano izquierda, párrafo 4	1-117
A	JOSIC D Y COL: "Purificación de anticuerpos monoclonales por HPLC de hidroxilapatita y HPLC de exclusión por tamaño" BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER. MAR 1991, vol. 372, no. 3, Marzo de 1991 (1991-03), páginas 149-156, XP009047266 ISSN: 0177-3593 el documento completo	1-117
A	STEVENS A Y COL: "TÉCNICAS PARA PURIFICAR ANTICUERPOS MONOCLONALES" AMERICAN BIOTECHNOLOGY LABORATORY, vol. 3, no. 5, 1985, páginas 22, 24-26, 28, XP009047296 ISSN: 0749-3223 el documento completo	1-117
A	COPPOLA G Y COL: "Cromatografía líquida de alta eficiencia de aminoácidos, péptidos y proteínas. XCIII. Comparación de métodos para la purificación de autoanticuerpos monoclonales de inmunoglobulina M de ratón" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. 4 DE AGOSTO DE 1989, vol. 476, 4 de Agosto de 1989 (1989-08-04), páginas 269-290, XP001206272 ISSN: 0021-9673 el documento completo	1-117

X2

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.
Attn: Garrett, Arthur S.
1300 I Street, NW
Washington, DC 20005-3315
UNITED STATES OF AMERICA

RECEIVED

MAY 27 2005

Finnegan, Henderson, Farabow,
Garrett & Dunner

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 8702.146-304	Date of mailing (day/month/year) 23/05/2005
FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/US2004/032883	International filing date (day/month/year) 06/10/2004
Applicant WYETH	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the international search report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Catriona Cleere <i>OKH</i> <i>5/27/05</i> <i>JNS</i>
---	---

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

Article 19 due 7-23-05

PCT national phase due 5-27-05

105-due

5-23-05

(See notes on accompanying sheet)

73

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

7/16

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Office, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 8702.146-304	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/032883	International filing date (day/month/year) 06/10/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 27/10/2003
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

7/6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/032883

14

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/06 B01D15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIOVANNINI ROBERTO ET AL: "Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 73, no. 6, 20 June 2001 (2001-06-20), pages 522-529, XP002327112 ISSN: 0006-3592 cited in the application abstract page 524, left-hand column, paragraph 2 - page 525, right-hand column, paragraph 1 figure 3 -/-	1-6, 8-21, 23-36, 38-52, 55-69, 74-86, 91-103, 108-117

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2005

Date of mailing of the international search report

23/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstein 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIOVANNINI R ET AL: "Comparison of different types of ceramic hydroxyapatite for the chromatographic separation of plasmid DNA and a recombinant anti-rhesus D antibody." BIOSEPARATION. 2000, vol. 9, no. 6, 2000, pages 359-368, XP009047265 ISSN: 0923-179X page 365, right-hand column, paragraph 2 figure 5	1-6, 8-21, 23-36, 38-52, 55-69, 74-86, 91-103, 108-117
A	TARDITI L ET AL: "Selective high-performance liquid chromatographic purification of bispecific monoclonal antibodies" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 599, 1992, pages 13-20, XP002981686 ISSN: 0021-9673 cited in the application page 15, left-hand column, paragraph 4	1-117
A	JOSIC D ET AL: "Purification of monoclonal antibodies by hydroxylapatite HPLC and size exclusion HPLC." BIOLOGICAL CHEMISTRY HÖPPE-SEYLER. MAR 1991, vol. 372, no. 3, March 1991 (1991-03), pages 149-156, XP009047266 ISSN: 0177-3593 the whole document	1-117
A	STEVENS A ET AL: "TECHNIQUES FOR PURIFYING MONOCLONAL ANTIBODIES" AMERICAN BIOTECHNOLOGY LABORATORY, vol. 3, no. 5, 1985, pages 22, 24-26, 28, XP009047296 ISSN: 0749-3223 the whole document	1-117
A	COPPOLA G ET AL: "High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XCIII. Comparison of methods for the purification of mouse monoclonal immunoglobulin M autoantibodies." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. 4 AUG 1989, vol. 476, 4 August 1989 (1989-08-04), pages 269-290, XP001206272 ISSN: 0021-9673 the whole document	1-117

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
19 de Mayo de 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/044856 A2

(31) Clasificación Internacional de Patentes: C07K 16/06,
B01D 15/08

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GE, GB, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/032883

(22) Fecha de Registro Internacional:
6 de Octubre de 2004 (06.10.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/514,018 27 de Octubre de 2003 (27.10.2003) US
60/523,335 20 de Noviembre de 2003 (20.11.2003) US

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farma, Madison, NJ 07940 (US).

Publicada:
— sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado en el caso de recibo de ese reporte

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): SUN, Shujun [US/US]; 43 Peabody Drive, Brentwood, NH 03833 (US). GALLO, Christopher [US/US]; 9 Karen Road, Windham, NH 03087 (US). KELLEY, Brian [US/US]; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155 (US).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(74) Agente: GARRETT, Arthur, S.; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P., 1300 I Street N.W., Washington, D.C. 20005-3315 (US).

(54) Título: ELIMINACIÓN DE AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR UTILIZANDO CROMATOGRFIA DE HIDROXIAPATITA

(57) Resumen: Esta invención se refiere a la aplicación de la cromatografía de hidroxipatita a la purificación de al menos un anticuerpo a partir de una preparación que contiene agregados de alto peso molecular. Además, esta invención se refiere a una integración de la cromatografía de hidroxipatita cerámica dentro de un protocolo cromatográfico en combinación para la eliminación de agregados de alto peso molecular a partir de una preparación de anticuerpo.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 May 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/044856 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C07K 16/06, B01D 15/08
- (21) International Application Number: PCT/US2004/032883
- (22) International Filing Date: 6 October 2004 (06.10.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/514,018 27 October 2003 (27.10.2003) US
60/523,335 20 November 2003 (20.11.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): SUN, Shujun [US/US]; 43 Peabody Drive, Brentwood, NH 03833 (US). GALLO, Christopher [US/US]; 9 Karen Road, Windham, NH 03087 (US). KELLEY, Brian [US/US]; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155 (US).
- (74) Agent: GARRETT, Arthur, S.; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P., 1300 I Street N.W., Washington, D.C. 20005-3315 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: REMOVAL OF HIGH MOLECULAR WEIGHT AGGREGATES USING HYDROXYAPATITE CHROMATOGRAPHY

(57) Abstract: This invention relates to the application of hydroxyapatite chromatography to the purification of at least one antibody from a preparation containing high molecular weight aggregates. Further, this invention relates to an integration of ceramic hydroxyapatite chromatography into a combination chromatographic protocol for the removal of high molecular weight aggregates from an antibody preparation.

WO 2005/044856 A2

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

18

Para:		PCT																									
ver forma PCT/ISA/220		OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/032883	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 06.10.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 27.10.2003																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/06, B01D15/08																											
Solicitante WYETH																											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases de la opinión</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.				☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☐	Casilla No. II	Prioridad	☐	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																									
☐	Casilla No. II	Prioridad																									
☐	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																									
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																									
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																									
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																									
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																									
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																									
Nombre y dirección de correo de la ISA: Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Funcionario Autorizado Ulbrecht, M Teléfono No. +49 89 2399-7710																									

24

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☐ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☐ en formato escrito
☐ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/032883**

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones 1-117 No: Reivindicaciones
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones 7, 22, 37, 53, 54, 70-73, 87-90, 104-107 No: Reivindicaciones 1-6, 8-21, 23-36, 38-52, 55-69, 74-86, 91-103, 108-117
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 1-117 No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Re ítem V.

1. Se hace referencia al siguiente documento

D1: GIOVANNINI ROBERTO ET AL: "Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 73, no. 6, 20 de Junio de 2001 (2001-06-20), páginas 522-529

D2: GIOVANNINI R ET AL: "Comparison of different types of ceramic hydroxyapatite for the chromatographic separation of plasmid DNA and a recombinant anti-rhesus D antibody". BIOSEPARATION. 2000, vol. 9, no. 6, 2000, páginas 359-368

2. La materia objeto reivindicada de las reivindicaciones 1-117 es novedosa puesto que la combinación de las características sugeridas en dichas reivindicaciones no se revela en la técnica anterior (Art. 33(2) PCT).

3.1 El propósito de la reivindicación 1 es solucionar el problema de proporcionar un método para purificar un anticuerpo de una preparación de anticuerpos que contienen HMWA. La solución sugerida por la reivindicación 1 comprende la disociación del anticuerpo de una resina de hidroxiapatita usando un amortiguador que comprende 1-20 mM de fosfato de sodio y 0.2-2.5 M NaCl, donde se elude el anticuerpo de dicha resina o se previene que se una a ella. D1, sin embargo, enseña que un anticuerpo se une a una resina de hidroxiapatita en un amortiguador que contiene 1 mM de fosfato pH 6.0 y 1 M NaCl (p. 525, c. 1, para. 1 - c. 2, para. 1; Fig. 3) es decir, bajo condiciones que de conformidad con la reivindicación 1 deben permitir una purificación del anticuerpo con base en la disociación de dicha resina. Por lo tanto, al método según se sugiere en la reivindicación 1 le falta reproducibilidad (Art. 5 PCT) y no puede considerarse que el problema anterior haya sido solucionado por las características técnicas sugeridas en la reivindicación 1. A dicha reivindicación, por lo tanto, le falta nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).

La misma argumentación también aplica en vista de D2 (p. 365, c. 2, para. 2; Fig. 5).

3.2 También aplican consideraciones semejantes a las reivindicaciones 15, 31, 48, 65, 81 y 99 (Art. 33(3) PCT).

3.3 La Fig. 3 de D1 enseña que el escape del anticuerpo de la resina de hidroxiapatita ocurre a aproximadamente 35 mM fosfato. Por lo tanto, para las consideraciones bajo V. 3.1 tampoco puede reconocerse un nivel inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 5, 20, 35, 52, 69, 86 y 103.

- 3.4 La concentración de NaCl de 1M sugerida por las reivindicaciones 6, 21 y 36 es idéntica a aquella usada en D1 (Supra). Por lo tanto, por las razones dadas bajo V. 3.1, tampoco se considera que estas reivindicaciones establezcan un nivel inventivo.
- 3.5 Las características adicionales sugeridas por las reivindicaciones 2, 3, 8-14, 16-18, 23-30, 32, 33, 38-47, 49, 50, 55-64, 66, 67, 74-80, 82-84, 91-98, 100, 101 y 108-117 sugieren características técnicas que no solucionan el problema de reproducibilidad formulado bajo V. 3.1 (Art. 5 PCT). Por lo tanto, por las mismas razones que bajo V.3.1 a estas reivindicaciones también les falta un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
- 3.6 El rango de pH sugerido por las reivindicaciones 4, 19, 34, 51, 68, 85, 102 sugiere rangos de pH bastante amplios cuyo límite inferior es cercano al pH de 6.0 del amortiguador enseñado en D1. Además, la solicitud únicamente proporciona ejemplos prácticos dentro de estos rangos para amortiguadores específicos que tienen un pH de 6.8, 7.2 o 7.3. Por lo tanto, no es creíble que el problema de reproducibilidad en vista de D1 sea solucionado por un pH que cae dentro del rango sugerido por dichas reivindicaciones. Por consiguiente, la argumentación respecto a la falta de nivel inventivo bajo V.3.1 también aplica a estas reivindicaciones (Art. 33(3) PCT).
- 3.7 Las reivindicaciones 7, 22, 37, 53, 54, 70-73, 87-90 y 104-107 proporcionan condiciones de cromatografía que se reflejan en los ejemplos prácticos revelados en esta solicitud. Estas condiciones permiten una purificación de anticuerpos de la preparación del anticuerpo que contiene HMWA con base en una absorción/desorción diferencial de HMWA y monómeros de anticuerpo a una resina de hidroxiapatita bajo estas condiciones. Por lo tanto, se considera que estas reivindicaciones comprenden un nivel inventivo (Art. 33(3) PCT).
4. Se reconoce la aplicabilidad industrial de la materia objeto de las reivindicaciones 1-117 (Art. 33(4) PCT).
- 5.1 Las reivindicaciones 2, 3, 17, 18, 32, 33, 49, 50, 66, 67, 83, 84, 100 y 101 se refieren al resultado deseable del método de purificación reivindicado que equivale a una definición de la materia objeto reivindicada en términos del problema implícito; es decir, en términos del resultado que se va a obtener. Estas reivindicaciones deben reformularse para proporcionar las características técnicas necesarias para solucionar dicho problema y por lo tanto dar una definición clara del alcance de dichas reivindicaciones (Art. 6 PCT).

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2004/032883

- 5.2 También, las reivindicaciones 65, 81 y 99 han sido formuladas en términos de un resultado que se obtendrá ("bajo condiciones que permitan monómero y agregados de alto peso molecular" y "permitiendo ... desplazar al monómero ligado"), lo cual escasamente equivale a una afirmación del problema implícito, sin proporcionar las características técnicas necesarias para lograr este resultado. Por consiguiente, la definición de dichas reivindicaciones no es clara (Art. 6 PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

24

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/032883

International filing date (day/month/year)
06.10.2004

Priority date (day/month/year)
27.10.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K18/06, B01D15/08

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80286 Munich
Tel. +49 89 23696 - 0 Tx: 523656 spm u d
Fax: +49 89 23696 - 4465

Authorized Officer:

Ullbrecht, M

Telephone No. +49 89 23696-7710



27

25

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/032883

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

28

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/032883

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-117
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	7,22,37,53,54,70-73,87-90,104-107
	No: Claims	1-6,8-21,23-36,38-52,55-69,74-86,91-103,108-117
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-117
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re item V.

1. Reference is made to the following document
 - D1: GIOVANNINI ROBERTO ET AL: "Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 73, no. 6, 20 June 2001 (2001-06-20), pages 522-529
 - D2: GIOVANNINI R ET AL: "Comparison of different types of ceramic hydroxyapatite for the chromatographic separation of plasmid DNA and a recombinant anti-rhesus D antibody." BIOSEPARATION, 2000, vol. 9, no. 6, 2000, pages 359-368
2. The subject-matter of claims 1-117 is novel as the combination of features suggested in said claims is not disclosed in the prior art (Art. 33(2) PCT).
- 3.1 Claim 1 aims at solving the problem of providing a method of purifying an antibody from an antibody preparation containing HMWA. The solution suggested by claim 1 involves the dissociation of the antibody from a hydroxyapatite resin using a buffer comprising 1-20 mM sodium phosphate and 0.2-2.5 M NaCl, whereby the antibody is either eluted from the said resin or prevented from binding thereto. D1, however, teaches that an antibody binds to a hydroxyapatite resin in a buffer containing 1 mM phosphate pH 6.0 and 1 M NaCl (p. 525, c. 1, para. 1 - c. 2, para. 1; Fig. 3) ie under conditions which according to claim 1 should allow a purification of the antibody based on its dissociation from the said resin. Hence, the method as suggested by claim 1 lacks reproducibility (Art. 5 PCT) and the foregoing problem cannot be considered as being solved by the technical features suggested by claim 1. Said claim therefore lacks an inventive step (Art. 33(3) PCT).
The same argumentation also applies in view of D2 (p. 365, c. 2, para. 2; Fig. 5).
- 3.2 Similar considerations also apply to claims 15, 31, 48, 65, 81 and 99 (Art. 33(3) PCT).
- 3.3 Fig. 3 of D1 teaches that the antibody elution from the hydroxyapatite resin occurs at approximately 35 mM phosphate. Hence, for the considerations under V. 3.1 also no inventive step can be acknowledged for the subject-matter of claims 5, 20, 35, 52, 69,

86 and 103.

- 3.4 The NaCl concentration of 1M suggested by claims 6, 21 and 36 are identical to that used in D1 (supra). Hence, for the reasons given under V. 3.1, these claims are also not considered to establish an inventive step.
- 3.5 The additional features suggested by claims 2, 3, 8-14, 16-18, 23-30, 32, 33, 38-47, 49, 50, 55-64, 66, 67, 74-80, 82-84, 91-98, 100, 101 and 108-117 suggest technical features which do not overcome the problem of reproducibility formulated under V. 3.1 (Art. 5 PCT). Hence, for the same reasons as under V. 3.1 also these claims lack an inventive step (Art. 33(3) PCT).
- 3.6 The pH range suggested by claims 4, 19, 34, 51, 68, 85, 102 suggest fairly broad pH ranges whose lower limit is close to the pH of 6.0 of the buffer taught by D1. Moreover, the application only provides workable examples within these ranges for specific buffers having a pH of 6.8, 7.2 or 7.3. It is therefore not credible that the problem of reproducibility in view of D1 is overcome by any pH falling within the range suggested by the said claims. Consequently, the argumentation with respect to lack of inventive step under V. 3.1 also applies too these claims (Art. 33(3) PCT).
- 3.7 Claims 7, 22, 37, 53, 54, 70-73, 87-90 and 104-107 provide conditions of chromatography which reflect on workable examples disclosed in the present application. These conditions allow a purification of antibodies from the an antibody preparation containing HMWA on the basis of differential absorption/desorption of HMWA and antibody monomers to a hydroxyapatite resin under these conditions. Hence, these claims are considered to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).
4. Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-117 is acknowledged (Art. 33(4) PCT).
- 5.1 Claims 2, 3, 17, 18, 32, 33, 49, 50, 66, 67, 83, 84, 100 and 101 refer to the desirable outcome of the claimed purification method which amounts to a definition of the claimed subject-matter in terms of the underlying problem ie in terms of the result to be achieved. These claims should be reformulated so as to provide the technical

features necessary to solve the said problem and thereby give a clear definition of the scope of said claims (Art. 6 PCT).

- 5.2 Also claims 65, 81 and 99 have been formulated in terms of a result to be achieved ("under conditions that allow of both monomer and high molecular weight aggregates" and "allowing the ... to displace bound monomer"), which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. Consequently, the definition of said claims is not clear (Art. 6 PCT).

**ELIMINACIÓN DE AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR UTILIZANDO
CROMATOGRAFÍA DE HIDROXIAPATITA**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la aplicación de la cromatografía de hidroxapatita a la purificación de al menos un anticuerpo a partir de una preparación que contiene agregados de alto peso molecular. Además, esta invención se refiere a una integración de la cromatografía de hidroxapatita cerámica dentro de un protocolo cromatográfico en combinación para la eliminación de agregados de alto peso molecular a partir de una preparación de anticuerpo.

**ELIMINACIÓN DE AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR UTILIZANDO
CROMATOGRAFÍA DE HIDROXIAPATITA**

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a los métodos para remover agregados de alto peso molecular de una preparación de anticuerpo, utilizando cromatografía de hidroxiapatita. En ciertas realizaciones de esta invención, la cantidad de agregados de alto peso molecular, presentes en la preparación final puede ser reducida significativamente, tal como de 40% a menos del 1%.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Es deseable identificar los métodos útiles para purificar las proteínas que no destruyen, o que reducen significativamente la actividad biológica de la proteína. Los contaminantes deben ser removidos de las preparaciones de anticuerpo antes de que éstos puedan ser utilizados en aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas, biología celular aplicada y estudios funcionales. Las preparaciones de anticuerpo cosechadas de líneas celulares de hibridoma, por ejemplo, frecuentemente contienen componentes no deseados, tales como agregados de alto peso molecular (HMWA, por sus siglas en inglés) del anticuerpo producido por la línea celular. Esta formación de agregados puede afectar de manera adversa la seguridad del producto al provocar

activación del complemento o anafilaxis después de la administración. Además, la formación de agregados puede impedir los procesos de fabricación al provocar rendimiento disminuido del producto, ensanchamiento del pico y pérdida de actividad.

Los métodos de purificación de proteínas más comunes están abocados a diferencias en el tamaño, la carga y la solubilidad entre la proteína que va a ser purificada y los contaminantes. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen la cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de interacción hidrofóbica. Estos métodos cromatográficos, no obstante, algunas veces presentan dificultades técnicas en la separación de las especies de anticuerpos agregados o multiméricos. Las técnicas tales como la cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, por ejemplo, pueden inducir la formación de agregados debido a una concentración incrementada de proteína o los cambios requeridos en la concentración del amortiguador y/o el pH durante la elución. Además, en varios casos los anticuerpos muestran diferencias en los puntos isoeléctricos, que son demasiado pequeños para permitir su separación mediante cromatografía de intercambio iónico. Tarditi, J. Immunol. Methods 599:13-20 (1992). La cromatografía de exclusión de tamaño es problemática y da como resultado la

dilución significativa del producto, lo cual es un impedimento en los procesos de fabricación basados en eficiencia, a escala grande. La fuga de los ligandos desde las columnas de cromatografía de afinidad puede también ocurrir, lo cual da como resultado combinación indeseable en el producto eluido. Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69 (2000). Los Solicitantes intentaron eliminar HMWA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8 utilizando cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico, así como cromatografía de interacción hidrofóbica. No obstante, todos estos métodos fueron incapaces de remover sustancialmente los HMWA de la preparación del anticuerpo GDF-8.

La cromatografía de hidroxapatita es un método para purificar las proteínas, que utiliza un fosfato de calcio hidroxilado, insoluble $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que forma la matriz y el ligado. Los grupos funcionales consisten de pares de iones de calcio positivamente cargados (sitios C) y cúmulos de grupos fosfato negativamente cargados (sitios P). Las interacciones entre la hidroxapatita y las proteínas son complejas y de modos múltiples. En un método de interacción, no obstante, los grupos amino positivamente cargados sobre las proteínas se asocian con los sitios P negativamente cargados, y los grupos carboxilo de las proteínas interactúan mediante complejación de formación a los sitios C. Shepard, J. of Chromatography 891:93-98 (2000).

La hidroxiapatita cristalina fue el primer tipo de hidroxiapatita utilizada en cromatografía, pero ésta estuvo limitada por dificultades estructurales. La cromatografía de hidroxiapatita cerámica (CHA) fue desarrollada para superar algunas de las dificultades asociadas con la hidroxiapatita cristalina, tales como las velocidades de flujo limitadas. La hidroxiapatita cerámica tiene alta durabilidad, buena capacidad de enlace a las proteínas, y puede ser utilizada a velocidades de flujo y presiones más altas que la hidroxiapatita cristalina. Vola et al., *BioTechniques* 14:650-655 (1993).

La hidroxiapatita ha sido utilizada en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, así como anticuerpos. En la cromatografía de hidroxiapatita, la columna es nuevamente equilibrada, y la muestra aplicada, en una baja concentración de amortiguador de fosfato y las proteínas adsorbidas son luego eluidas en un gradiente de concentración del amortiguador de fosfato. Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529 (2000). Algunas veces gradientes de más baja profundidad de fosfato de sodio son exitosamente utilizados para eluir proteínas, mientras que en otros casos los gradientes de concentración hasta de 400 mM de fosfato de sodio han sido utilizados con éxito. Ver por ejemplo, Stanker, J. *Immunological Methods* 76:157-169 (1985) (gradiente de elución de fosfato de sodio de 10 mM hasta 30 mM); Shepard, J.



Chromatography 891:93-98 (2000) (gradiente de elución de fosfato de sodio de 10 mM hasta 74 mM); Tarditi, J. Chromatography 599:13-20 (gradiente de elución de fosfato de sodio de 10 mM hasta 350 mM). Mientras que las sales tales como cloruro de sodio han sido incorporadas en el amortiguador de enlace para purificar un anticuerpo utilizando la cromatografía de hidroxapatita, Giovannini, R. Biotechnology and Bioengineering 73:522-529 (2000), las sales tales como cloruro de sodio y sulfato de amonio no eran conocidas como promotoras de afectar la elución de las proteínas en la cromatografía de hidroxapatita. Karlsson et al., Ion Exchange Chromatography, in Protein Purificación, VCH Publishers, Inc. (Janson y Ryden eds., 1989).

En varios casos, los investigadores han sido capaces de eluir selectivamente los anticuerpos a partir de hidroxapatita o encontraron que la cromatografía de hidroxapatita no daba como resultado un producto suficientemente puro. Junbauer, J. Chromatography 476:257-268 (1989); Giovannini, Biotechnology and Bioengineering 73:522-529 (2000). Los Solicitantes intentaron sin éxito separar los agregados de alto peso molecular de una preparación de anticuerpos utilizando la cromatografía de hidroxapatita cerámica y una elución con fosfato de calcio basada en las enseñanzas de la técnica anterior (Figura 1). Además, las condiciones de elución severas, cuando son utilizadas en un

intento para romper el fuerte enlace de una proteína a una matriz, se saben que destruyen la actividad biológica de una proteína. De este modo, existe la necesidad para métodos eficientes de eliminar impurezas, tales como los agregados de alto peso molecular, de las preparaciones de anticuerpo que no destruyan la actividad biológica de los anticuerpos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los Solicitantes encontraron sorprendentemente que el cloruro de sodio puede ser utilizado en un nuevo método de cromatografía de hidroxapatita para la purificación de inmunoglobulinas y eliminación de HMWA de diferentes materias primas (figura 2). De este modo, la presente invención se refiere a los métodos para eliminar agregado de alto peso molecular de las preparaciones de anticuerpo, mediante contacto de dicha preparación con una resina de hidroxapatita y eluir selectivamente el anticuerpo de la resina. Alternativamente, la preparación de anticuerpo puede ser intercambiada con amortiguador en un amortiguador de equilibrio, y luego se deja fluir a través de una resina de hidroxapatita. Una combinación de estos métodos de cromatografía de hidroxapatita de enlace/flujo de lado a lado, puede ser también utilizada para purificar preparaciones de anticuerpo.

La invención caracteriza un amortiguador de elución o amortiguador de carga que contiene de 1 a 20 mM de fosfato

de sodio y de 0.2 a 2.5 mM de cloruro de sodio, en donde el amortiguador de elución y el amortiguador de carga tiene un pH de 6.4 a 7.6.

En una combinación en el modo de enlace/flujo de lado a lado, la invención caracteriza a un amortiguador de equilibrio y el amortiguador de lavado que contienen de 1 a 20 mM de fosfato de sodio, de 0.01 a 2.0 M de cloruro de sodio, de 0 a 200 mM de arginina, y de 0 a 200 mM de HEPES, en donde el amortiguador de equilibrio y el amortiguador de lavado tienen un pH de 6.2 a 8.0.

En una modalidad, el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

En una realización adicional, el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

En una realización adicional, la preparación de anticuerpo contiene al menos un anticuerpo IgG. Más específicamente, la preparación de anticuerpo contiene al menos un anticuerpo elegido del anti-receptor de IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

Puede ser utilizado al menos un método de purificación en combinación con la cromatografía de hidroxipatita de la invención. Una variedad de métodos de purificación podrían ser utilizados, incluyendo, pero no

limitados a, cromatografía de proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía de exclusión de tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, cromatografía de intercambio aniónico, y/o cromatografía de intercambio catiónico.

En una modalidad, la cromatografía de intercambio aniónico y de proteína A se utilizan en combinación con la cromatografía de hidroxapatita cerámica. La cromatografía de intercambio aniónico de proteína A pueden ser utilizadas en combinación, por ejemplo, al poner en contacto la preparación de anticuerpo con un soporte de proteína A, permitiendo que el anticuerpo se adsorba hacia el soporte, lavando el soporte y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de proteína A, eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de proteína A, poniendo en contacto la preparación con un soporte de intercambio iónico, permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte, lavando el soporte con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico, poniendo en contacto el flujo de lado a lado del intercambio iónico, con una resina de hidroxapatita, permitiendo que el flujo de lado a lado se adsorba a la resina, lavando la resina con al menos un amortiguador de lavado de hidroxapatita, y eluyendo el anticuerpo purificado de la resina, con al menos un amortiguador de elución de

hidroxiapatita.

En una realización adicional, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de proteína A pueden ser utilizadas en combinación, por ejemplo, mediante la puesta en contacto de la preparación con un soporte de proteína A perdiendo que el anticuerpo se adsorba al soporte de proteína A, lavando el soporte de proteína A y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de proteína A eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de proteína A, poniendo en contacto el eluido de proteína A con un soporte de intercambio iónico, permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte de intercambio iónico, lavando el soporte de intercambio iónico con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico, intercambiando el flujo de lado a lado del intercambio hacia un amortiguador de carga que comprende de 1 a 20 mM de fosfato de sodio y de 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio, poniendo en contacto el flujo de lado a lado del intercambio iónico con una resina de hidroxiapatita, permitiendo que el anticuerpo fluya a través de la resina de hidroxiapatita, y lavando la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de lavado de hidroxiapatita.

En otra modalidad, la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de proteína A se utilizan en combinación con la cromatografía de hidroxiapatita cerámica.

La cromatografía de intercambio aniónico y de proteína A pueden ser utilizadas en combinación, por ejemplo, al poner en contacto la preparación de anticuerpo con un soporte de proteína A, permitiendo que el anticuerpo se adsorba hacia el soporte, lavando el soporte y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de proteína A, eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de proteína A, poniendo en contacto la preparación con un soporte de intercambio iónico, permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte, lavando el soporte con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico, poniendo en contacto el flujo de lado a lado del intercambio con una resina de hidroxiapatita, permitiendo el flujo de lado a lado para adsorberse a la resina, permitiendo el enlace de HMWA más fuerte que el monómero de anticuerpo y, conforme continua la carga, el desplazamiento del monómero enlazado por el HMWA, lavando la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de lavado de hidroxiapatita, y recolectando el monómero de anticuerpo desplazado.

Los objetivos y ventajas adicionales de la invención serán descritos en parte en la descripción siguiente, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención serán realizados y alcanzados por medio de los elementos en combinaciones particularmente

señalados en las reivindicaciones anexas.

Se debe entender que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicatorias únicamente, y no son restrictivas de la invención como se reclama.

Las figuras anexas, las cuales son incorporadas en y constituyen parte de esta especificación, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 demuestra la incapacidad de la elución en gradiente de fosfato de la técnica anterior para separar HMWA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8.

La figura 2 demuestra que el uso de la elución en gradiente del cloruro de sodio da como resultado la separación de una gran porción de HMWA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8.

La figura 3 muestra la separación de HMWA de una preparación de anticuerpo anti-CD22 utilizando cromatografía de cHA.

La figura 4 muestra la separación de HMWA de una preparación de anticuerpo anti-Abeta utilizando cromatografía de cHA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda ser más fácilmente comprendida son primeramente definidos ciertos términos. Las definiciones adicionales son descritas a todo lo largo de la descripción detallada.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmonoglobulina o fragmento de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprenda un sitio de enlace al antígeno. El término incluye, pero no está limitado a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, de cadena simple, quiméricas, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados, y generados in vitro. El término "anticuerpo" también incluye los fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab)₂, Fv, scFv, Fd, dAv, y otros fragmentos de anticuerpo que conservan función de enlace al antígeno. Típicamente, tales fragmentos podrían comprender un dominio de enlace al antígeno.

Los anticuerpos que pueden ser también purificados por la invención incluyen las formas químicamente modificadas tales como mediante tratamiento con PEG, y proteínas de fusión que comprenden una porción de inmunoglobulina. El anticuerpo o fragmento del mismo pueden ser seleccionadas de cualquiera de los isotipos de anticuerpos conocidos y sus conformaciones, por ejemplo, los monómeros de IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, dímeros de IgA, trímeros de IgA, o pentámeros de IgM.

El término "preparación de anticuerpo" se refiere a cualquier composición que contenga un anticuerpo y/o componentes no deseados, tales como agregados de alto peso molecular de tales anticuerpos.

"hidroxiapatita cerámica" o "CHA" se refiere a un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de la fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que ha sido sinterizado a altas temperaturas en forma de cerámica macroporosa esférica. El término "CHA" abarca, pero no está limitado a, la hidroxiapatita cerámica del tipo 1 y del tipo 2. A no ser que se especifique, "CHA", se refiere a cualquier tamaño de partícula incluyendo, pero no limitado a, 20, 40 y 80 μm .

El término "agregados de alto peso molecular" o "HMWA" se refiere a una asociación de al menos dos anticuerpos. La asociación puede surgir mediante cualquier método, incluyendo pero no limitado a, el enlace covalente, no covalente, enlace disulfuro, o reticulación no reducible. Al menos dos anticuerpos pueden enlazarse al mismo o a diferentes antígenos. Al menos dos anticuerpos pueden estar en la forma de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo u otras formas descritas en la definición de "anticuerpo" anteriormente mencionada.

El término "modo de flujo de lado a lado" se refiere a una técnica de separación de la preparación de anticuerpo en la cual al menos un anticuerpo contenido en la preparación

está destinado a fluir a través de una resina cromatográfica o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante potencial o impureza se enlaza a la resina o al soporte cromatográfico. El modo de flujo de lado a lado puede ser utilizado, por ejemplo, en la cromatografía de hidroxapatita y en la cromatografía de intercambio iónico.

"Modo de enlace" se refiere a una técnica de separación de la preparación de anticuerpo, en la cual al menos un anticuerpo contenido en la preparación se enlaza a una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza fluye al través. El modo de enlace puede ser utilizado, por ejemplo, en la cromatografía de hidroxapatita y en la cromatografía de intercambio iónico.

B. Descripción del Método

La presente invención proporciona los métodos para remover agregados de alto peso molecular (HMWA) de las preparaciones de anticuerpo utilizando la cromatografía de hidroxapatita en el modo de enlace, en el modo de flujo de lado a lado, o una combinación de los mismos. La presente invención tiene aplicación a la purificación a gran escala de las preparaciones de anticuerpo.

En el modo de enlace, el método utiliza un soporte de hidroxapatita cargado con fosfato a pH neutro, y baja fuerza iónica para enlazarse al anticuerpo y a HMWA. La columna es luego lavada con un amortiguador de fosfato para

eliminar las impurezas enlazadas sueltamente. En seguida, el anticuerpo es selectivamente eluido utilizando un amortiguador de fosfato de alta fuerza iónica que contiene 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio a pH ligeramente ácido a ligeramente alcalino. HMWA es opcionalmente lavado subsecuentemente de la resina utilizando un amortiguador de mayor fuerza iónica y de mayor concentración de fosfato, a pH neutro. Al final, la resina es opcionalmente regenerada utilizando una solución de hidróxido de sodio y de fosfato de potasio.

En el modo de flujo de lado a lado, una preparación de anticuerpo es intercambiada con amortiguador, en un amortiguador de carga que contiene cloruro de sodio 0.2 a 2.5 M, a pH ligeramente ácido a ligeramente alcalino. La preparación de anticuerpo se deja luego fluir a través de una columna de hidroxapatita, mientras que las impurezas tales como HMWA se enlazan a la columna. La columna es de manera opcional, subsecuentemente lavada para permitir que los anticuerpos purificados adicionales fluyan a través de la columna. Al final, la columna puede ser opcionalmente depurada y luego regenerada utilizando una solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

En el modo de enlace/flujo de lado a lado, en combinación, la preparación de anticuerpos se deja fluir a través de una columna de hidroxapatita, con el monómero de anticuerpo y el HMWA que se enlazan inicialmente. No obstante,

conforme continua la carga, el HMWA que entra es capaz de enlazarse más fuertemente que el monómero del anticuerpo, y por lo tanto desplaza al monómero enlazado. En consecuencia, el monómero desplazado fluye a través de la columna. La columna es opcionalmente lavada subsecuentemente para permitir que los anticuerpos desplazados adicionales fluyan a través de la columna. Al final, la columna puede ser opcionalmente depurada con una solución de alta concentración de sal, de alta concentración de fosfato, y luego regenerada utilizando una solución de hidróxido de sodio y de fosfato de potasio.

En una realización de la invención, el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de HMWA, en una modalidad, menos de 3% de HMWA, y en otra modalidad, menos de 1% de HMWA.

1. Los anticuerpos

Las preparaciones de anticuerpo de la invención pueden ser aisladas de un número de fuentes, incluyendo, pero no limitadas a, suero de animales inmunizados, fluido de ascitis, sobrenadantes de hibridoma o de mieloma, medios condicionados derivados del cultivo de una línea celular recombinante que expresa la molécula de anticuerpo, y de todos los extractos celulares de las células productoras de anticuerpo. En una realización de la invención, son purificados los anticuerpos provenientes de los medios de cultivos celulares condicionados, de una variedad de líneas celulares recombinantes productoras de anticuerpo. Aunque se

puede esperar alguna variación de línea celular a línea celular y entre los diversos productos de anticuerpo, con base en la descripción de la presente, está muy por dentro del panorama de una persona de experiencia en la técnica, el adaptar la invención descrita en la presente, a una combinación particular de la proteína del anticuerpo y la línea celular productora.

Para fines de ilustración únicamente, esta invención fue aplicada a la purificación de varios anticuerpos del isotipo IgG y pI básico. Más específicamente, esta invención fue aplicada a los anticuerpos monoclonales contra GDF-8 descritas por la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 60/419,964 (de aquí en adelante "Myo-29"), los anticuerpos monoclonales específicos reactivos con el antígeno CD22 descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/428,894 (de aquí en adelante "anti-CD22"), y los anticuerpos monoclonales con el antígeno Abeta descritos por la Solicitud Internacional No. PCT/US01/14687 (de aquí en adelante "anti-Abeta"). La construcción de los sistemas recombinantes para la producción de Myo-29 y los anticuerpos CD22 y Abeta son detallados en las solicitudes anteriormente mencionadas.

2. La Resina de hidroxapatita

Diversas resinas cromatográficas de hidroxapatita son disponibles comercialmente, y cualquier forma disponible

del material puede ser utilizado en la práctica de esta invención. En una realización de la invención, la hidroxiapatita está en una forma cristalina. Las hidroxiapatitas para el uso en esta invención pueden ser aquellas que son aglomeradas para formar partículas y sinterizadas a altas temperaturas en una masa de cerámica porosa estable.

El tamaño de partícula de la hidroxiapatita puede ser variada ampliamente, pero un tamaño de partícula típico está en un intervalo de 1 μm a 1,000 μm de diámetro, y puede ser de 10 μm a 100 μm . En una realización de la invención, el tamaño de partícula es de 20 μm . En otra realización más de la invención, el tamaño de partícula es de 40 μm . En una realización más de la invención, el tamaño de partícula es de 80 μm .

Un número de soportes cromatográficos pueden ser empleados en la preparación de las columnas CHA, los más extensamente utilizados son hidroxiapatita del tipo I y tipo II. El tipo I tiene una alta capacidad de enlace a las proteínas, y mejor capacidad para proteínas ácidas. El tipo II no obstante, tiene una menor capacidad de enlace a las proteínas, pero tiene mejor resolución de los ácidos nucleicos y de ciertas proteínas. El material tipo II también tiene una muy baja afinidad para la albúmina, y es especialmente adecuado para la purificación de muchas especies y clases de

inmunoglobulinas. La elección de un tipo de hidroxiapatita particular puede ser determinada por el experto en la técnica.

Esta invención puede ser utilizada con la elección de hidroxiapatita que está suelta, empaquetada en una columna, o en un cromatógrafo anual continuo. En una realización de la invención, la resina de hidroxiapatita cerámica es empaquetada en una columna. La elección de las dimensiones de la columna puede ser determinada por la persona experta. En una realización de la invención, un diámetro de columna de al menos 0.5 cm con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm puede ser utilizada para la purificación a pequeña escala. En una realización adicional de la invención, un diámetro de columna de aproximadamente 35 cm a aproximadamente 60 cm puede ser utilizado. En otra realización más de la invención, un diámetro de columna de 60 cm a 85 cm puede ser utilizado. En ciertas realizaciones de la invención, una suspensión de la resina de hidroxiapatita cerámica en solución de Na_2HPO_4 200 mM a pH 9.0, puede ser utilizada para empaquetar la columna a una velocidad de flujo constante de aproximadamente 4 cm/minuto o con gravedad.

3. Composiciones Amortiguadoras y Condiciones de Carga

Antes de poner en contacto la resina de hidroxiapatita con la preparación de anticuerpo puede ser necesario ajustar los parámetros tales como el pH, la fuerza iónica y la temperatura, y en algunos casos, la adición de

sustancias de diferentes tipos. De este modo, es un paso opcional realizar un equilibrio de la matriz de hidroxiapatita al lavarla con una solución (por ejemplo, un amortiguador para ajustar el pH, la fuerza iónica, etc., o para la introducción de un detergente) que lleva las características necesarias para la purificación de la preparación de anticuerpo.

En la cromatografía de hidroxiapatita en el modo en combinación de enlace/flujo de lado a lado, la matriz de hidroxiapatita es equilibrada y lavada con una solución, con lo cual se llevan las características necesarias para la purificación de la preparación de anticuerpos. En una realización de la invención, la matriz puede ser equilibrada utilizando una solución que contiene de 0.01 a 2.0 M de cloruro de sodio a pH ligeramente alcalino a ligeramente ácido. Por ejemplo, el amortiguador de equilibrio puede contener 1 a 20 mM de fosfato de sodio, en otra realización más, éste puede contener 1 a 10 mM de fosfato de sodio, en otra realización más éste puede contener 2 a 5 mM de fosfato de sodio, en otra realización más éste puede contener fosfato de sodio 2 mM, y en otra realización más éste puede contener fosfato de sodio 5 mM. El amortiguador de equilibrio puede contener 0.01 a 2.00 mM de cloruro de sodio, en una modalidad, 0.025 a 0.5 M de cloruro de sodio, y en otra realización más, cloruro de sodio 0.05 M, en otra realización más, cloruro de sodio 0.1 M. El pH del amortiguador de carga puede estar en el

intervalo de 6.2 a 8.0. En una modalidad, el pH puede ser de 6.6 a 7.7, y en otra realización más, el pH puede ser de 7.3. El amortiguador de equilibrio puede contener 0 a 200 mM de arginina, en una realización más, éste puede contener arginina 120 mM, y otra realización más, éste puede contener arginina 100 mM. El amortiguador de equilibrio puede contener HEPES 0 a 200 mM, en otra realización más, éste puede contener HEPES 20 Mm, y en otra realización más, éste puede contener HEPES 100 Mm.

La preparación de anticuerpo puede también ser intercambiada con amortiguador en un amortiguador apropiado o amortiguador de carga, en la preparación para la cromatografía de hidroxapatita en el modo de flujo de lado a lado. En una realización de la invención, la preparación de anticuerpo puede ser intercambiada con amortiguador en un amortiguador de carga que contiene 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio a pH ligeramente ácido a ligeramente alcalino. Por ejemplo, el amortiguadores de carga puede contener 1 a 20 mM de fosfato de sodio, en otra realización más, éste puede contener 2 a 8 mM de fosfato de sodio, en otra realización más, éste puede contener 3 a 7 mM de fosfato de sodio, y en otra realización más, puede contener 5 mM de fosfato de sodio. El amortiguador de carga puede contener 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio, en una modalidad, 0.2 a 1.5 M de cloruro de sodio, en otra modalidad, 0.3 a 1.0 M de cloruro de sodio, y en otra

realización más, cloruro de sodio 350 mM. El pH del amortiguador de carga puede estar en el intervalo de 6.4 a 7.6. En una modalidad, el pH puede ser de 6.5 a 7.0, y en una realización más, el pH puede ser de 6.8.

El contacto de una preparación de anticuerpo a la resina de hidroxiapatita ya sea en el modo de enlace, en el modo de flujo de lado a lado, o combinaciones de los mismos, puede ser realizado en una columna de lecho empaquetado, una columna de lecho fluidizado/expandido que contiene la matriz de fase sólida y/o en una operación de lote simple, donde la matriz de fase sólida es mezclada con una solución por un cierto tiempo.

Después del contacto de la resina de hidroxiapatita con la preparación de anticuerpo, se realiza opcionalmente un procedimiento de lavado. No obstante, en algunos casos donde la pureza muy alta de la inmunoglobulina no es crítica o no es requerida anticuerpo adicional que fluye de lado a lado, el procedimiento de lavado puede ser omitido, ahorrando un paso del proceso, así como solución de lavado. Los amortiguadores de lavado empleados dependerán de la naturaleza de la resina de hidroxiapatita, del modo de la cromatografía de hidroxiapatita que se emplea, y por lo tanto puede ser determinado por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. En modo de flujo de lado a lado y en el modo en combinación de enlace/flujo de lado a lado, el flujo de lado a

lado del anticuerpo purificado, obtenidos después de un lavado opcional de la columna, puede ser combinado con otras fracciones del anticuerpo purificado.

En el modo de enlace, el anticuerpo puede ser eluido de la columna después del procedimiento de lavado opcional. Para la elución del anticuerpo desde la columna, esta invención utiliza un amortiguador de fosfato de alta fuerza iónica que contiene aproximadamente 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio a un pH ligeramente ácido a ligeramente alcalino. Por ejemplo, el amortiguador de elución puede contener 1 a 20 mM de fosfato de sodio, en otra realización más éste puede contener 2 a 8 mM de fosfato de sodio, en otra realización más, éste puede contener 2 a 6 mM de fosfato de sodio, en otra realización más éste puede contener fosfato de sodio 3 mM, y en otra realización más éste puede contener fosfato de sodio 5 mM. El amortiguador de elución puede contener 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio, en una modalidad, 0.2 a 1.5 M de cloruro de sodio, en una modalidad, 0.3 a 1.1 M de cloruro de sodio, en otra realización 1.0 M de cloruro de sodio, y en otra realización más, 0.35 M de cloruro de sodio. El pH del amortiguador de elución puede estar en el intervalo de 6.4 a 7.6. En una modalidad, el pH puede ser de 6.5 a 7.3, en otra realización más, el pH puede ser de 7.2, y en otra realización más, el pH puede ser de 7.8. El amortiguador de elución puede ser alterado para la elución del anticuerpo a partir de la

columna, en un gradiente continuo o gradual.

En el modo de enlace, en el modo de flujo de lado a lado, y combinaciones de los mismos, una matriz de fase sólida puede ser opcionalmente lineal, por ejemplo, depurada y regenerada, después de la elución o el flujo de lado a lado del anticuerpo. Este procedimiento es típicamente realizado regularmente para reducir al mínimo la constitución e impurezas sobre la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la matriz, para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

Los componentes amortiguadores pueden ser ajustados de acuerdo al conocimiento de la persona de experiencia ordinaria en la técnica. Los intervalos de la composición del amortiguador de muestra y los ejemplos para el modo de enlace, el modo de flujo de lado a lado y las combinaciones de modo de enlace/flujo de lado a lado son proporcionados en la tabla 1, tabla 2 y tabla 3, respectivamente. No todos los amortiguadores o pasos son necesarios, pero son proporcionados para ilustración únicamente. Por ejemplo, puede no ser necesario tener dos distintos pasos de equilibrio, y puede no ser necesario depurar, regenerar o almacenar la resina de hidroxiapatita. Una selección de alto rendimiento, como se describe en el ejemplo 11, puede ser utilizado para optimizar eficientemente las condiciones del amortiguador para la cromatografía de columna cHA.

Tabla 1. Intervalos de la composición de amortiguador
ejemplar para el modo de enlace

Amortiguador	Intervalo de la composición	Composición(es) ejemplar
Equilibrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 M Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Equilibrio 2	1 mM a 20 mM de fosfato de sodio 0 a 200 mM de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 5.0 M Cloruro de sodio 50 mM pH 7.2
Lavado	1 mM a 20 mM de fosfato de sodio 0 a 200 mM de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 5.0 M Cloruro de sodio 50 mM pH 7.2
Elución	1 mM a 20 mM de fosfato de sodio 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.6	Fosfato de sodio 5.0 M Cloruro de sodio 350 mM pH 6.8; o fosfato de sodio 3.0 mM cloruro de sodio 1.0 M pH 7.2

Depuración	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 mM Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Regeneración	0.5 mM a 1.0 mM de fosfato de potasio 1.0 M de NaOH	Fosfato de potasio 0.5 M NaOH 1.0 M
Almacenamiento	10 a 50 mM de NaOH	NaOH 20 mM

Tabla 2. Intervalos de la composición de amortiguador
ejemplar para el modo de flujo de lado a lado

Amortiguador	Intervalo de la composición	Composición(es) ejemplar
Equilibrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 M Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Equilibrio 2	1 a 20 mM de fosfato de sodio 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.6	Fosfato de sodio 5.0 M Cloruro de sodio 350 mM pH 6.8
Amortiguador de carga	1 a 20 mM de fosfato de sodio 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.6	Fosfato de sodio 5.0 M Cloruro de sodio 350 mM pH 6.8

SA

Lavado	1 a 20 mM de fosfato de sodio 0.2 a 2.5 M de cloruro de sodio pH 6.4 a 7.6	Fosfato de sodio 5.0 mM Cloruro de sodio 350 mM pH 6.8
Depuración	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 mM Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Regeneración	0.5 mM a 1.0 mM de fosfato de potasio NaOH 1.0 M	Fosfato de potasio 0.5 M NaOH 1.0 M
Almacenamiento	10 a 50 mM de NaOH	NaOH 20 mM

Tabla 3. Intervalos de la composición de amortiguador
ejemplar para el modo de combinación de enlace/flujo de lado a
lado

Amortiguador	Intervalo de la composición	Composición(es) ejemplar
Equilibrio 1	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 M Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Equilibrio 2	1 a 20 mM de fosfato de sodio 0.01 a 2.0 M de cloruro de sodio 0 a 200 mM de arginina 0 a 200 mM de HEPES pH 6.2 a 8.0	Fosfato de sodio 2.0 M Cloruro de sodio 50 mM, Arginina 100 mM HEPES 100 mM, pH 7.3; ó Fosfato de sodio 5.0 mM Cloruro de sodio 100 mM, Arginina 120 mM, HEPES

Lavado	1 mM a 20 mM de fosfato de sodio 0.01 a 2.0 mM de cloruro de sodio 0 a 200 mM de arginina 0 a 200 mM de HEPES pH 6.2 a 8.0	Fosfato de sodio 2.0 M Cloruro de sodio 50 mM, Arginina 100 mM HEPES 100 mM, pH 7.3; ó Fosfato de sodio 5.0 mM Cloruro de sodio 100 mM, Arginina 120 mM, HEPES 20 mM, pH 7.3
Depuración	10 mM a 500 mM de fosfato de sodio Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.4 a 7.4	Fosfato de sodio 0.3 mM Cloruro de sodio 1.0 M pH 6.8
Regeneración	0.5 mM a 1.0 mM de fosfato de potasio NaOH 1.0 M	Fosfato de potasio 0.5 M NaOH 1.0 M
Almacenamiento	10 a 50 mM de NaOH	NaOH 20 mM

En una realización de la invención, la carga sobre la resina cHA, por ejemplo, a un reto de carga de ≤ 20 mg/ml y un nivel de agregado inicial en la carga de $\leq 40\%$ de HMWA. En ciertas realizaciones de la invención, un reto de carga de 1.8

58

a 10.4 mg/ml puede ser utilizado con un nivel de agregado inicial en la carga de aproximadamente 15%.

En una realización adicional de la invención, la resina cHA es cargada a un reto de carga de al menos 20 mg/ml y un nivel de agregado inicial en la carga de ≤ 40 de HMWA. En ciertas realizaciones de la invención, un reto de carga de 30 a 40 mg/ml puede ser utilizado con un nivel de agregado inicial en la carga de aproximadamente 27%.

4. Pasos Opcionales Adicionales

Aunque se ha descubierto que la cromatografía de hidroxapatita puede ser utilizada sola para separar la IgG monomérica de los agregados, como se mencionó anteriormente, el método de purificación de la invención puede ser utilizado en combinación con otras técnicas de purificación de proteínas. En una realización de la invención, uno o más pasos que preceden el paso de hidroxapatita pueden ser deseables para reducir el reto de carga de los contaminantes o las impurezas. En otra realización más de la invención, uno o más pasos de purificación después del paso de hidroxapatita pueden ser deseables para eliminar contaminantes o impurezas adicionales.

El procedimiento de purificación de cHA descrito puede ser opcionalmente combinado con otros pasos de purificación, incluyendo pero no limitados a, cromatografía de proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de

interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía de exclusión de tamaño, dialfiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, y/o cromatografía de intercambio iónico.

En una modalidad, antes del paso de purificación de cHA, los medios de cosecha pueden ser opcionalmente inicialmente purificados mediante un paso de cromatografía de proteína A. Por ejemplo, PROSEP-A^{MR} (Millipore, Reino Unido), que consiste de la proteína A covalentemente acoplada a vidrio de poro controlado, puede ser útilmente empleada. Otras formulaciones de proteína A útiles incluyen la proteína A Sepharose FAST FLOW^{MR} (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), la proteína A TOYOPEARL^{MR} 650M (TosoHaas Co., Filadelfia, PA), y las columnas MABSELECT^{MR} (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Como un paso opcional previo a la purificación de cHA, puede ser empleada la cromatografía de intercambio iónico. A este respecto, varios sustituyentes aniónicos o catiónicos pueden ser acoplados a las matrices, con el fin de formar soportes aniónicos o catiónicos para la cromatografía. Los sustituyentes de intercambio aniónico incluyen los grupos dietilaminoetilo (DEAE), trimeilaminoetil-acrilamida (TMAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Los sustituyentes de intercambio catiónico incluyen los grupos carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico

celulósicas tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 son disponibles de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, Reino Unido. Los intercambiadores de iones basados en Sephadex y reticulados, son también conocidos. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM-, y SP-Sephadex, y DEAE-, Q-, CM- y S-Sepharose, y Sepharose son todos disponibles de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Además, el copolímero de etilenglicol-metacrilato derivatizado con DEAE y CM tales como TOYOPEARL^{MR} DEAE-650S o M y TOYOPEARL^{MR} CM-650S o M son disponibles de Toso Haas Co., Filadelfia, PA.

En una realización de la invención, la cromatografía de intercambio iónico puede ser utilizada en el modo de enlace o en modo de flujo de lado a lado.

En ciertas modalidades, el paso de cromatografía de proteína A es conducido primeramente, el paso de intercambio aniónico es conducido en segundo lugar, y el paso de cHA es conducido en tercer lugar.

5. Eliminación de Impurezas Adicionales

Además de la eliminación de HMWA, la cromatografía de cHA ha mostrado que es útil en la eliminación de otras impurezas a partir de las separaciones de anticuerpos. Otras impurezas que pueden ser eliminadas por los métodos de cromatografía de cHA de la invención incluyen, pero no están limitados a, ADN, proteína de células hospederas, virus advenedizos, y contaminantes de proteína A provenientes de los

24

pasos de purificación previos.

En una realización de la invención, la invención es capaz de eliminar la proteína A de la preparación de anticuerpos. En ciertas realizaciones de esta invención, la cantidad de proteína A presente en la preparación final puede ser reducida significativamente, tal como de 300 ppm a menos de 1 ppm.

C. Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para fines ilustrativos únicamente.

Ejemplo 1: Purificación de un anticuerpo anti-GDF-8

El proceso de purificación descrito más adelante fue desarrollado por un anticuerpo monoclonal anti-GDF-8 (denominado en la presente como "Myo-29"). El anticuerpo Myo-29 es un anticuerpo subtipo IgG1 y tiene un pI de aproximadamente 8.1. El proceso de purificación estuvo comprendido de tres pasos cromatográficos (afinidad de proteína A, intercambio aniónico, e hidroxapatita), un paso de inactivación viral y un paso de ultrafiltración/dialfiltración para concentrar e intercambiar el producto en un amortiguador final. Todos los pasos fueron realizados de 18 a 25°C, excepto el paso de cromatografía de proteína A el cual fue corrido de 2 a 8°C.

El proceso de purificación puede ser normalizado para cualquier escala. Las velocidades de flujo lineales

listadas son independientes del diámetro de columna y de las proporciones en carga son en masa por unidad de volumen. El paso de cromatografía de proteína A puede ser sometido a varios ciclos múltiples veces por lote para acomodar cantidades variantes de título de cultivo celular o en biorreactor de cosecha. Cada ciclo es considerado una operación unitaria separada y el combinado de elución es mantenido para el siguiente paso. El paso de proteína A tiene una capacidad de aproximadamente 35 gramos de Myo-29 por litro de MabSelect. Los pasos corriente abajo del proceso (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de hidroxapatita cerámica) son elevados de escala para acomodar aproximadamente 15 gramos de Myo-29 por litro de resina de intercambio aniónico y alrededor de 10 gramos de Myo-29 por litro de resina de hidroxapatita cerámica.

1. Eliminación de las Células del Cultivo

El anticuerpo Myo-29 fue expresado en células de ovario de Hámster Chino (CHO) y fue desarrollado en un tanque biorreactor de 2500 litros con agitación. Para cosechar el fluido de cultivo, las células fueron removidas utilizando un dispositivo de microfiltración Prostack (Millipore, Billerica, MA). El medio acondicionado clarificado (CCM) fue recolectado para el primer paso cromatográfico, la cromatografía de proteína A.

2. Paso de Purificación de Cromatografía de Afinidad de

Proteína A

Una columna MabSelect de 17.7 litros (30 cm de diámetro x 25 cm de altura) de la resina de la proteína A recombinante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de un amortiguador de equilibrio (Tris 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.5). El CCM fue aplicado a una columna de una velocidad de flujo de 2.5 cm/minuto y un reto de carga de 35 g de Myo-29 por litro de resina. Después de la carga, de la columna, ésta fue lavada con 5 volúmenes de columna de un amortiguador de lavado de alta concentración de sal (Tris 20 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 7.5), y luego con 10 volúmenes de columna de un amortiguador de lavado de baja concentración de sal (Tris 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.5). El Myo-29 fue eluido mediante la aplicación de 6 volúmenes de columna de un amortiguador de elución (arginina 100 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 3.0). El combinado de elución fue luego mantenido a pH de 3.6 ± 0.5 por 1.5 ± 0.5 horas como una medida profiláctica para facilitar la inactivación de los contaminantes de los virus advenedizos potenciales. El combinado de elución fue luego neutralizado a pH 7.3 con amortiguador HEPES 2 M a pH 8.0, para prevenir la degradación de las porciones lábiles al ácido de Myo-29.

Los efluentes de la columna fueron monitorizados mediante diversos parámetros, incluyendo la inspección visual

de la absorbancia de UV y los perfiles cromatográficos de conductividad, y la recuperación del producto utilizando HPLC de proteína A para el título de carga, y la absorbancia a 280 nm para la concentración del combinado de elución.

La columna fue depurada con clorhidrato de guanidina 6 M y luego lavada con el amortiguador de lavado de depuración (Tris 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.5). La columna fue almacenada en etanol al 16%.

3. Paso de Purificación de la Cromatografía de Intercambio Aniónico

El eluido de la columna de proteína A fue además purificado mediante cromatografía de intercambio aniónico sobre una columna de 75 litros (diámetro de 80 cm x 15 cm de longitud) de resina Q SEPHAROSE FF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de un primer amortiguador de equilibrio (HEPES 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.3) y luego con 5 volúmenes de columna de un segundo amortiguador de equilibrio (arginina 100 mM, cloruro de sodio 50 mM, HEPES 100 mM, pH 7.3). El eluido de la columna de proteína A fue aplicado a la columna equilibrada a una velocidad de flujo de 2.5 cm/minuto y a una proporción de carga de 15 gramos de Myo-29 por litro de resina. Después de la carga, la resina fue lavada con 5 volúmenes del segundo amortiguador de equilibrio. El flujo de lado a lado de la columna de intercambio aniónico fue

recolectado.

El flujo de lado a lado de la columna, recolectado, fue monitorizado mediante diversos parámetros, incluyendo la inspección visual de la absorbancia de UV y los perfiles cromatográficos de conductividad, y la recuperación del producto utilizando absorbancia a 280 nm.

La columna de intercambio aniónico fue depurada con amortiguador de depuración (HEPES 20 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 7.3) y regenerada con el amortiguador de regeneración (NaOH 500 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 13.3). La columna fue almacenada en hidróxido de sodio 0.01 M.

4. Filtración de Retención de Virus

El objetivo de este paso opcional fue la eliminación de las partículas similares a los retrovirus que pueden estar presentes en el cultivo de células CHO, y proporcionar seguridad adicional a través de la eliminación de los potenciales contaminantes de virus advenedizos. El flujo de lado a lado de la columna de intercambio aniónico fue recolectado y pasado a través de un filtro de uso simple Planova de 35 nm (Asahi-Kasei Corp., Nueva York, NY). El producto remanente en el módulo fue recuperado al hacer pasar amortiguador de lavado de la columna de intercambio aniónico (Arginina 100 mM, cloruro de sodio 50 mM, HEPES 100 mM, pH 7.3) a través del dispositivo.

La recuperación del producto después de la

JA

filtración de retención del virus fue evaluada mediante absorbancia a 280 nm y análisis de SDS-PAGE del combinado de Planova en comparación con los datos de funcionamiento histórico.

5. Paso de Purificación de Cromatografía cHA

La solución filtrada viral fue adicionalmente purificada con una columna de hidroxiapatita (60 cm x 20 cm) empaquetada con la resina tipo II cHA, tamaño de partícula 40 μ M (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8). Un segundo paso de equilibrio fue conducido con 4 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 2 (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 7.2). El medio parcialmente purificado fue cargado sobre la resina en un amortiguador de carga 1:1 (v/v) (fosfato de sodio 10 mM, pH 7.2) y a una velocidad de flujo de 2.5 cm/minuto. La columna cHA fue lavada con 3 volúmenes de columna de un amortiguador de lavado (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 7.2). El anticuerpo Myo-29 fue eluido de la resina cHA utilizando 6 volúmenes de columna de un amortiguador de elución (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 350 mM, pH 6.8).

El paso de purificación de cHA fue monitorizado mediante inspección visual de la absorbancia de UV y los perfiles cromatográficos de conductividad, la recuperación del

producto mediante observancia a 280 nm, eliminación de HMWA como se determinó mediante el análisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), y eliminación de la proteína A, como se determinó mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), competitivo.

La columna cHA fue depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y regenerado con el amortiguador de regeneración (fosfato de potasio 0.5 M, NaOH 1.0 mM, pH 13.3). La columna fue almacenada en NaOH 0.02 M. La tabla 4 demuestra que la cromatografía de cHA elimina efectivamente las impurezas de HMWA de las preparaciones de anticuerpo. Además, la cromatografía de cHA es capaz de eliminar otras impurezas, tales como proteína A.

Tabla 4. despejo de HMWA y rendimientos del monómero de anticuerpo

Muestra	% de carga de HMWA	% pico de HMWA	Carga de ProA (ppm)	Pico de ProA
1	14.6	1.0	17	BLOQ*
2	16.4	0.7	20	BLOQ
3	15.1	1.6	23	BLOQ
4	16.0	0.9	13	BLOQ

*BLOQ = Por debajo del límite de cuantificación de 1 ng/ml.

6. Ultrafiltración/Diafiltración y Filtración Final

El combinado de elución cHA se hizo pasar a través de un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial utilizando

casetes PLCTK Pellicon 2 (Millipore, Billerica, MA) compuestos de una membrana de celulosa regenerada compuesta, con un límite de peso molecular nominal de 30,000. Los objetivos de este paso fueron concentrar e intercambiar con amortiguador el combinado del producto cHA en el amortiguador de formulación. El combinado de producto cHA fue picado con una solución de sucrosa al 50% (p/v) para llevar la concentración de la sucrosa hasta el 2%. El anticuerpo Myo-29 fue concentrado a aproximadamente 20 gL⁻¹, luego diafiltrado con aproximadamente ≥ 9 volúmenes de lavado del amortiguador de la formulación (L-histidina 0.01 M, 2% de sucrosa, pH 6.0). Después de la terminación de la diafiltración, el producto fue adicionalmente concentrado hasta aproximadamente 60 gL⁻¹, y recuperado del aparato mediante drenado por gravedad y un soplado con aire, seguido por inundación de los canales del retenido, con el amortiguador de la formulación. El objetivo de concentración del Myo-29 en la sustancia medicinal es ≥ 35 g/L.

La sustancia medicinal Myo-29 fue finalmente filtrada a través de un filtro de 0.22 micrómetros, equilibrada con amortiguador de formulación (L-histidina 0.01 M, 2% de sucrosa, pH 6.0), repartidas en alícuotas en botellas, y luego almacenada a -80°C.

Ejemplo 2: Purificación de cHA de una Preparación de Anticuerpo Anti-GDF-8 Utilizando la Resina Tipo I

El anticuerpo Myo-29 fue también exitosamente purificado utilizando la resina cHA tipo I, con tamaño de partícula de 40 μ M, empaquetada en una columna de 3.1 litro. La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8). Se condujo un segundo paso de equilibrio con 4 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 2 (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 7.2). El medio parcialmente purificado proveniente de un paso de purificación de intercambio aniónico fue cargado sobre la resina a un reto de carga de 35 mg/ml y a una velocidad de flujo de 1.5 cm/minuto. La columna cHA fue lavada con 3 volúmenes de columna en un amortiguador de lavado (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 7.2). El anticuerpo Myo-29 fue eluido de la resina cHA utilizando 6 volúmenes de columna de un amortiguador de elución (fosfato de sodio 3 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 7.2).

La columna cHA fue depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y regenerada con el amortiguador de regeneración (fosfato de sodio 0.5 M, NaOH 1.0 M, pH 13.3). La columna fue almacenada en hidróxido de sodio 0.02 M.

El paso de purificación de cHA fue monitorizado mediante inspección visual de la absorbancia de UV y los perfiles cromatográficos de conductividad, la recuperación del

producto mediante absorbancia a 280 nm, la eliminación de HMWA como se determinó mediante análisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), y eliminación de proteína A como se determinó por un ensayo inmunsorbente ligado a enzima (ELISA) competitivo. Como se muestra en la tabla 5, la purificación de cHA utilizando la resina tipo I fue capaz de disminuir el porcentaje de HMWA desde 27% hasta 0.9% en el primer ciclo, y disminuir además el porcentaje de HMWA hasta 0.6% en el segundo ciclo. Además, la resina de tipo I acomodó un reto de más alta carga que aquel de la resina tipo II, mientras que todavía produce suficientemente rendimiento de monómero. Finalmente, la purificación de cHA utilizando la resina tipo I es capaz de disminuir la cantidad de impureza de proteína A.

Tabla 5. Despejo de HMWA y rendimientos del monómero de anticuerpo utilizando la resina tipo I

Muestra	% de HMWA	% de Rendimiento del monómero	Proteína A (ppm)
Carga cHA	27.0	N/A	169
Pico cHA (ciclo #1)	0.9	86.6	BLOQ*
Pico cHA (ciclo #2)	0.9	86.6	BLOQ

*BLOQ = Por debajo del límite de cuantificación de 1 ng/mL.

Ejemplo 3: Purificación de cHA de una Preparación de Anticuerpo Anti-CD22 y una Preparación de Anticuerpo Anti-Abeta Utilizando

la Resina Tipo I

El proceso de purificación de cHA descrito en el ejemplo 2 fue también capaz de eliminar suficientemente HMWA a partir de una preparación del anticuerpo anti-CD22 y de un anticuerpo anti-Abeta. El proceso utilizado fue similar a aquel descrito en el ejemplo 2, con la excepción de que el monómero de anticuerpo purificado fue eluido en gradiente en 15 volúmenes de columna del amortiguador de elución (fosfato de sodio 3 mM, cloruro de sodio 1.5 M, pH 7.2).

Como se demuestra en la tabla 6, la purificación de cHA utilizando la resina tipo I fue capaz de disminuir HMWA en la preparación de anticuerpo anti-CD22 hasta 0.5%, y en la preparación de anticuerpo anti-Abeta por debajo del límite de detección. Además, el paso de purificación de cHA fue capaz de eliminar los contaminantes de proteína A de la preparación de anticuerpo.

Tabla 6. Despejo de HMWA y Rendimiento del Monómero de anticuerpo utilizando la Resina tipo I en la Purificación de Preparaciones de Anticuerpo anti-CD22 y anti-Abeta

Muestra	% de HMWA	% de Rendimiento del monómero	Proteína A (ppm)
Carga de anti-CD22	3.7	N/A	30
Pico de anti-CD22	0.5	87	BLOQ*
Carga de anti-Abeta	1.87	N/A	40
Pico de anti-Abeta	0.0	89	BLOQ

*BLOQ = Por debajo del límite de cuantificación de 1 ng/ml.

Ejemplo 4: Purificación de cHA en el Modo de Flujo Lado a Lado de un Anticuerpo Anti-GDF-8

El anticuerpo Myo-29 fue también exitosamente purificado utilizando un protocolo de purificación de cHA en el modo de flujo de lado a lado. Una columna Vantage de 1.6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) fue empaquetada en el fosfato dibásico de sodio 200 mM, pH 9.0 utilizando la hidroxapatita cerámica tipo II Macro-Prep, con resina de tamaño de partícula de 40 μ m (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y 3 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 2 (cloruro de sodio 350 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8). La preparación del anticuerpo Myo-29 fue intercambiado con amortiguador en un amortiguador de carga de contenía cloruro de sodio 350 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8 y luego cargada sobre la columna cHA. La columna fue lavada con amortiguador de lavado (cloruro de sodio 350 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8) y depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y luego regenerada con el amortiguador de regeneración (fosfato de potasio 500 mM, NaOH 1.0 M, pH 13.3). Todas las velocidades de flujo fueron mantenidas a 2.5 a 3 cm/minuto. Los efluentes de columna fueron analizados mediante SEC-HPLC utilizando un sistema de HPLC.

Un resumen de la recuperación de Myo-29 y la eliminación del HMWA a partir de la preparación de anticuerpo se presenta en la tabla 7. La preparación contenía inicialmente 14.4% de HMWA (carga), que se redujo a 0.2% de HMWA (flujo de lado a lado), utilizando el método de purificación de cHA de la invención.

Tabla 7: Recuperación de Myo-29 y eliminación de HMWA

Muestra	% de recuperación de Myo-29	% de HMWA en la muestra
Carga	N/A	14.4
Flujo de lado a lado	79.6	0.2
Lavado	12.2	1.9
Post-lavado	1.5	5.6
Depuración	10.3	84.3

Ejemplo 5: Purificación de cHA en el Modo de Flujo de Lado a Lado de un Anticuerpo Anti-GDF-8 Utilizando la Resina Tipo I

Una columna Vantage de 1.1 x 21 cm (Millipore, Billerica, MA) fue empaquetada en fosfato dibásico de sodio 200 mM, pH 9.0 utilizando la hidroxiapatita cerámica tipo I Macro-Prep, resina de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 2 (cloruro de sodio 1.0 M, fosfato de sodio 3 mM, pH 7.2). La preparación del anticuerpo Myo-29

fue intercambiada con amortiguador en un amortiguador de carga que contenía cloruro de sodio 1.0 M, fosfato de sodio 3 mM, pH 7.2 y luego cargada sobre la columna cHA a un reto de carga de 26 mg/ml. La columna fue lavada con amortiguador de lavado (cloruro de sodio 1.0 M, fosfato de sodio 3 mM, pH 7.2), depurada con amortiguador de depuración (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y luego regenerada con 5 volúmenes de columna del amortiguador de regeneración (fosfato de sodio 500 mM, NaOH 1.0 M, pH 13.3). Las velocidades de flujo fueron mantenidas a menos de 90 cm/hora para la carga y el lavado, y menos de 240 cm/hora para el resto del proceso de purificación. Los eluyentes de columna fueron analizados mediante SEC-HPLC utilizando un sistema de HPLC.

La preparación del anticuerpo contenía inicialmente 27.2% de HMWA (carga), que fue reducida 6.1% de HMWA (flujo de lado a lado). Además, la recuperación del monómero de anticuerpo fue de 72%.

Ejemplo 6: Purificación de cHA de una Preparación de Anticuerpo Anti-CD22

La purificación de cromatografía de cerámica HA mostró también que es útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-CD22. Una columna Vantage de 1.6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) fue empaquetada en fosfato dibásico de sodio 200 mM, a pH 9.0 utilizando la hidroxapatita cerámica tipo II Macro-Prep, resina de tamaño

de partícula de 40 μm (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y 3 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 2 (cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8). Una preparación del anticuerpo anti-CD22 fue intercambiada con amortiguador en cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8 y luego cargada sobre la columna cHA. La columna fue lavada con 3 volúmenes de columna de amortiguador de lavado (cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8) y luego eluida en gradiente con fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8 en 15 volúmenes de columna. La columna fue depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y luego regenerada con el amortiguador de regeneración (fosfato de sodio 500 mM, NaOH 1.0 M). Todas las velocidades de flujo fueron mantenidas a 2.5 a 3 cm/minuto. Los efluentes de la columna fueron analizados mediante SEC-HPLC utilizando un sistema de HPLC.

Como se muestra en la figura 3, la purificación de cHA fue exitosa en la eliminación de HMWA de la preparación del anticuerpo anti-CD22. El porcentaje de HMWA en la carga fue de 1.7%, mientras que el porcentaje de HMWA en el eluido de cHA fue de 0.0%.

Ejemplo 7: Purificación de cHA de un Anticuerpo Anti-Abeta

La purificación por cromatografía de cerámica HA mostró también que es útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-Abeta. Una columna Vantage de 1.6 x 20 cm (Millipore) fue empaquetada en fosfato dibásico de sodio 200 mM a pH 9.0, utilizando la hidroxapatita cerámica tipo II Macro-Prep, resina de tamaño de partícula de 40 μ m (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 2 (cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8). Una preparación del anticuerpo anti-Abeta fue intercambiada con amortiguador en cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8 y luego cargada sobre la columna. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de amortiguador de lavado (cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 6.8) y luego eluida en gradiente con fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8 en 15 volúmenes de columna. La columna fue depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y luego regenerada con el amortiguador de regeneración (fosfato de potasio 500 mM, hidróxido de sodio 1.0 M). Todas las velocidades de flujo son mantenidas a 2.5 a 3 cm/minuto. Los efluentes de la columna fueron analizados mediante SEC-HPLC utilizando un sistema de HPLC.

Como se muestra en la figura 4, la purificación de

CHA fue exitosa en eliminar HMWA de la preparación del anticuerpo anti-Abeta. El porcentaje de HMWA en la carga fue de 2.6%, mientras que el porcentaje de HMWA en el eluido de CHA fue de 0.0%.

Ejemplo 8: Evaluación de la Actividad del Anticuerpo Myo-20 Purificado

El anticuerpo anti-GDF-8 purificado de acuerdo al método descrito en el ejemplo 1, Myo-29, fue evaluado para la actividad de enlace utilizando un ensayo inmunsorbente ligado a enzima (ELISA), competitivo. La ELISA competitiva puede ser adaptada para probar la actividad de enlace de otros anticuerpos purificados. Ver por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Land (eds.) 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Un receptor de GDF-8, ActRII β .Fc (2 μ g/ml), fue adsorbido sobre una placa de microtitulación de 96 pozos en un volumen de 100 μ l/pozo. La placa fue luego incubada de 2 a 8°C toda la noche. La placa fue lavada dos veces con amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 0.05% de Tween 20) y bloqueada con una solución al 4% de albúmina sérica bovina (BSA) para reducir al mínimo el enlace no específico. La placa fue incubada a temperatura ambiente por 1.5 a 3.0 horas y lavada dos veces con el amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 0.05% de Tween 20).

El estándar de referencia del anticuerpo Myo-29 fue diluido en serie 4 veces en el diluyente de ensayo (0.5% de

BSA, cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2.7 mM), dando como resultado un total de 8 puntos estándares. Las muestras de prueba contenían las fracciones del anticuerpo Myo-29 purificadas mediante un paso de cromatografía de proteína A, así como las fracciones purificadas después de un paso adicional de purificación de cHA. Estas muestras de prueba fueron también diluidas en serie dos veces en diluyente de ensayo para dar como resultado 8 puntos que caían dentro del intervalo de la curva estándar. Los estándares y las muestras de prueba fueron agregados a los pozos de ensayo apropiados a 50 µl/pozo. El competidor biotinilado, GDF-8 marcado con biotina (50 ng/ml) fue luego agregado a cada pozo a 50 µl/pozo. La placa fue incubada toda la noche sobre un agitador de placa a temperatura ambiente.

La placa fue lavada cuatro veces con el amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 0.05% de Tween 20) y el GDF-8 marcado con biotina, enlazado fue detectado con la adición de 100 µl/pozo de peroxidasa de rábano conjugada a la estreptavidina (1:5,000; Southern Biotech, Birmingham, Alabama). La placa fue incubada de 50 a 70 minutos sobre el agitador de placa a temperatura ambiente, y luego revelada mediante la adición de 100 µl/pozo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, Owings, Mills, MD). La absorbancia para cada pozo es determinada a 450 nm con un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La cantidad de

Myo-29 activo en la muestra de prueba es indirectamente proporcional a la señal generada en el ensayo. La reacción fue detenida mediante la adición de 100 µl/pozo de H₂SO₄ 0.18 M.

Una concentración de Myo-29 capaz de enlazarse a las muestras de prueba de GDF-8 biotiniladas se interpoló a partir de la curva estándar que había sido ajustada utilizando una ecuación logística de 4 parámetros. El valor de bioactividad (% de proteína activa) de una muestra de prueba fue luego computado al dividir la concentración de la proteína activa (determinada por ELISA) entre la concentración de proteína total (determinada por A₂₈₀) y multiplicando esa proporción por 100. Si la misma muestra fue purificada en lotes separados, fueron calculados promedios del valor de bioactividad. Los valores de bioactividad son reportados en la tabla 8.

Tabla 8: Actividad de Enlace del Anticuerpo Anti-GDF-8 (% de Proteína Activa)

Muestra	Purificación Post-proteína A	Purificación Post-CHA
1	88	108
2	86	104
3	94	108

Como se demuestra en la tabla 8, Myo-29 conserva su habilidad para enlazarse a GDF-8 después de ser purificado mediante el proceso descrito en el ejemplo 1. La actividad de enlace del Myo-29 purificado que es algo menor en laceraciones

pico del eluyente a partir de la purificación de proteína A. No obstante, la actividad de enlace excede el anticuerpo de referencia Myo-29 después de un paso de purificación adicional de cHA como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 9: Purificación de cHA en el Modo de Combinación de Enlace/Flujo de Lado a Lado, de un Anticuerpo Anti-GDF-8

La purificación por cromatografía de HA cerámica en un modo en combinación de enlace/flujo de lado a lado, mostró también que es útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8. El experimento detallado más adelante fue corrido sobre un sistema de FPLC AKTA (General Electric). Una columna Vantage de 1.1 x 21 cm (Millipore) fue empaquetada en fosfato dibásico de sodio 200 mM a pH 9.0, utilizando la hidroxapatita cerámica tipo II Macro-Prep, resina con tamaño de partícula de 40 μ m (BioRad, Hercules, CA). La columna fue equilibrada con 3 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8) y 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 2 (cloruro de sodio 50 mM, fosfato de sodio 2.0 mM, arginina 100 mM, HEPES 100 mM, pH 7.3). Una preparación de anticuerpo anti-GDF-8 fue cargada sobre la columna con un reto de carga de 20 mg/ml. La columna fue lavada con el amortiguador de equilibrio 2, depurada con el amortiguador de depuración (fosfato de sodio 300 mM, cloruro de sodio 1.0 M, pH 6.8), y luego regenerada con el amortiguador de

regeneración (fosfato de potasio 500 mM, hidróxido de sodio 1.0 M, pH 13.3). La velocidad de flujo para la carga y el lavado fue de 1.5 cm/minuto. Las velocidades de flujo para el resto del proceso de purificación fueron mantenidas a 2.5 a 3.0 cm/minuto. Los efluentes de la columna fueron analizados mediante SEC-HPLC utilizando un sistema de HPLC.

Los resultados demostraron que la operación de la resina cHA tipo II en el modo de combinación de enlace/flujo de lado a lado, es efectivo para eliminar HMWA de las preparaciones de anticuerpo. La preparación inicialmente contenía 27% de HMWA (carga), que fue reducida a 1.1% de HMWA (flujo de lado a lado) utilizando el método de purificación de cHA de la invención.

Ejemplo 10: Combinación de cHA en el Modo en Combinación de Enlace/Flujo de Lado a Lado de un Anticuerpo Anti-GDF-8 Utilizando la Resina Tipo I

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 9, utilizando la resina cHA tipo I en lugar de la resina cHA tipo II. Las condiciones del amortiguador fueron idénticas a aquellas utilizadas en el ejemplo 9, con la excepción del amortiguador de equilibrio 2, que estuvo compuesto de fosfato de sodio 5.0 mM, cloruro de sodio 100 mM, arginina 120 mM, HEPES 20 mM, a un pH de 7.3.

Como se muestra en la tabla 9, la operación de la resina cHA tipo I en el modo en combinación de enlace/flujo de

lado a lado es efectiva para eliminar HMWA de las preparaciones de anticuerpo mientras que se mantienen los rendimientos del monómero de anticuerpo. Además, el modo de combinación de enlace/flujo de lado a lado es efectivo para eliminar las impurezas de la proteína A. Finalmente, la resina cHA tipo I permitió un resto de carga incrementada de 55 mg/ml.

Tabla 9: Despejo de HMWA y rendimientos de monómero de anticuerpo a partir de la resina cHA tipo I operada en el modo en combinación de enlace/flujo de lado a lado

Muestra		% de HMWA	% de rendimiento del monómero	Proteína A (ppm)
Corrida 1	Carga	27.0	NA	236
	Pico	0.9	75	3.3
Corrida 2	Carga	27.2	NA	--
	Pico	0.7	76	--

Ejemplo 11: Selección de Alto Rendimiento de las Condiciones de Amortiguador de cHA

Una selección de alto rendimiento fue realizada para optimizar las condiciones de amortiguador utilizadas para purificar una preparación del anticuerpo Myo-029 utilizando una resina cHA tipo I. La selección varió los niveles de fosfato de sodio, cloruro de sodio, arginina y Myo-029 sobre la resina cHA tipo I y examinó el grado de enlace de Myo-029 y

el agregado de alto peso molecular (HMWA) a la resina.

50 µl de la resina cHA tipo I fueron agregados a cada pozo de una placa de filtro de 96 pozos. Cada pozo, marcado A1, A2...H11, H12 en las tablas 10-12, fue equilibrado en el amortiguador de equilibrio constituido de HEPES 20 mM, pH 7.2 y una combinación única de fosfato (tabla 10), cloruro de sodio (tabla 11), y arginina (tabla 12).

Tabla 10: Niveles de fosfato en cada pozo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
B	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
C	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
D	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
E	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
F	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
G	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
H	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM

Tabla 11: Niveles de cloruro de sodio en cada pozo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25	25	25	25	25	25	750	625	500	500	400	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
B	25	25	25	25	25	25	750	625	500	500	400	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM

C	50	100	200	50	100	200	1250	1750	2500	600	800	1000
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
D	50	100	200	50	100	200	1250	1750	2500	600	800	1000
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
E	25	25	25	25	25	25	750	625	500	500	400	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
F	25	25	25	25	25	25	750	625	500	500	400	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
G	50	100	200	50	100	200	1250	1750	2500	600	800	1000
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
H	50	100	200	50	100	200	1250	1750	2500	600	800	1000
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM

Tabla 12: Niveles de arginina en cada pozo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	350	300	200	12	12	12	12	12	12	75	50	25
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
B	450	500	600	40	120	200	40	120	200	125	150	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
C	350	300	200	12	12	12	12	12	12	75	50	25
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
D	450	500	600	40	120	200	40	120	200	125	150	300
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
E	350	300	200	12	12	12	12	12	12	75	50	25
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM

F	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40 mM	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM
G	350 mM	300 mM	200 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	75 mM	50 mM	25 mM
H	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40 mM	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM

Después de que se agregó a cada pozo el amortiguador de equilibrio único se agregó a cada pozo una mezcla de Myo-029 y agregado. El nivel de agregado en el reto de carga fue de 25%. Los constituyentes del amortiguador fueron mantenidos al mismo nivel que durante el equilibrio. El material fue quitado por 20 minutos, permitiendo que fuera alcanzado el equilibrio. El sobrenadante fue removido de cada pozo de la placa de filtro. Otra etapa de adición de la preparación de anticuerpo fue realizada, y la placa fue agitada y el sobrenadante eliminado. Fueron realizadas hasta siete etapas. La proteína que no se había enlazado a cada etapa fue analizada para determinar la concentración de proteína total (por absorbancia a A280 nm). La cantidad de monómero y el agregado fue medida mediante HPLC de exclusión de tamaño. Cualquier disminución en el agregado indicó una condición conducente a la purificación. Las tablas 13 y 14 muestran el porcentaje de agregado y de monómero, por pozo, en un combinado de las primeras cuatro etapas.

90

Tabla 13. Nivel de agregado (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8%	6%	3%	4%	7%	16%	3%	3%	3%	5%	3%	3%
B	12%	15%	17%	3%	3%	5%	3%	4%	4%	6%	5%	5%
C	7%	6%	3%	4%	4%	3%	5%	4%	4%	6%	6%	4%
D	13%	14%	14%	6%	4%	7%	5%	6%	4%	8%	8%	7%
E	11%	10%	6%	4%	19%	11%	5%	6%	7%	9%	8%	6%
F	15%	19%	20%	4%	3%	10%	6%	8%	10%	10%	10%	17%
G	10%	9%	6%	6%	3%	7%	8%	14%	17%	10%	16%	22%
H	16%	18%	20%	4%	5%	17%	9%	15%	17%	12%	17%	18%

Tabla 14. Recuperación del Monómero (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51%	44%	24%	3%	3%	2%	43%	34%	25%	53%	32%	11%
B	64%	70%	78%	4%	24%	43%	42%	40%	38%	57%	42%	44%
C	49%	43%	27%	4%	6%	23%	60%	62%	62%	58%	60%	48%
D	65%	68%	75%	5%	35%	54%	61%	64%	64%	63%	63%	62%
E	61%	58%	44%	3%	3%	5%	58%	62%	64%	66%	65%	63%
F	70%	76%	88%	5%	33%	63%	59%	63%	68%	67%	68%	74%
G	57%	57%	50%	4%	7%	65%	72%	82%	85%	70%	80%	83%
H	71%	75%	85%	5%	48%	75%	69%	82%	88%	71%	80%	87%

97

La selección de alto rendimiento fue capaz de predecir de manera cualitativa la recuperación del monómero y la eliminación de HMWA en un esquema de purificación en columna. Por ejemplo, las condiciones del pozo C8 (HEPES 20 mM, fosfato 1 mM, NaCl 1750 mM, y arginina 12 mM, pH 7.2) fueron probadas sobre una columna empaquetada con una resina cHA Tipo I. Los niveles de agregado fueron reducidos a 2.5%, y el rendimiento del monómero fue de 72%, después de la purificación en columna. Las condiciones del pozo D5 (HEPES 20 mM, fosfato 5 mM, NaCl 100 mM, y arginina 120 mM, pH 7.2) fueron también probadas en una columna empaquetada con la resina cHA 1. Los niveles de agregado fueron reducidos al 0.7% y el rendimiento del monómero fue de 73%, después de la purificación en columna. Finalmente, las condiciones equivalentes al pozo C3 (HEPES 100 mM, fosfato 1 mM, NaCl 120 mM, y arginina 200 mM, pH 7.2, donde el alto nivel de HEPES contribuye a la fuerza iónica, similarmente al cloruro de sodio) fueron probadas sobre una columna empaquetada con la resina cHA-1. Los niveles de agregado fueron reducidos al 4% con una recuperación del monómero del 69%, después de la purificación en columna. Estos resultados demuestran que la selección de alto rendimiento subestima el funcionamiento de la columna como se midió por la recuperación del monómero y la recuperación de HMWA. No obstante, la selección de alto rendimiento es capaz de predecir de manera cualitativa el

rendimiento y la pureza.

Todas las referencias citadas en la presente son incorporadas aquí por referencia en su totalidad, y para todos los propósitos al mismo grado como si cada publicación o patente individual o solicitud de patente fuera específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los fines. Al grado en que las publicaciones y patente o solicitudes de patente incorporadas por referencia contradigan la descripción contenida en la especificación, se pretende que la especificación reemplace y/o tome precedencia sobre cualquier material contradictorio tal.

Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y así sucesivamente, utilizados en la especificación y las reivindicaciones deben de ser entendidos como que son modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la especificación y las reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. Al menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe ser construido a la luz del número de dígitos significativos y procedimientos

de redondeo ordinarios.

Muchas modificaciones y variaciones de esta invención pueden ser realizadas sin apartarse de su espíritu y alcance, como serán aparentes por aquellos expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en la presente son ofrecidas a manera de ejemplo únicamente, y no se pretende que sean limitantes de ningún modo. Se pretende que la especificación y los ejemplos sean considerados como ejemplares únicamente, con un alcance y espíritu verdadero de la invención que son indicados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado el método porque comprende:

(a) poner en contacto la preparación de anticuerpo con una resina de hidroxiapatita y eluyendo el anticuerpo purificado de la resina con al menos un amortiguador de elución que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M; o

(b) poner en contacto una resina de hidroxiapatita con una preparación de anticuerpo en amortiguador de carga que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M, y permitiendo que el anticuerpo purificado fluya a través de la columna.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga tiene un pH de 6.4 a 7.6.

45

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga contiene fosfato de sodio 3 mM o 5 mM.

6. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga contiene cloruro de sodio 1 M o 0.35 M.

7. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga tiene un pH de 6.8 ó 7.2.

8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

15. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado el método porque comprende someter la preparación de anticuerpo a (a) cromatografía de afinidad de Proteína A, (b) cromatografía de intercambio iónico, y (c) cromatografía de hidroxiapatita,

(i) en donde el anticuerpo purificado es eluido de la resina de hidroxiapatita utilizando un amortiguador de elución que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M; o

(ii) poner en contacto una resina de hidroxiapatita con una preparación de anticuerpo en un amortiguador de carga que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M y permitiendo que el anticuerpo purificado fluya a través de la columna.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la cromatografía de afinidad de Proteína A es realizada primeramente, y la cromatografía de hidroxiapatita es realizada al final.

17. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

18. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

19. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga tiene un pH de 6.4 a 7.6.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga contiene fosfato de sodio 3 mM o 5 mM.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga contiene cloruro de sodio 1 M o 0.35 M.

22. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el amortiguador de elución o el amortiguador de carga tiene un pH de 6.8 ó 7.2.

23. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

24. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

25. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

26. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

27. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

29. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

30. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

31. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado porque comprende:

(a) poner en contacto la preparación con un soporte de Proteína A;

(b) permitiendo al anticuerpo se adsorba al soporte

de Proteína A;

(c) lavar el soporte de Proteína A y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de Proteína A;

(d) eluye el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de Proteína A;

(e) poner en contacto el eluido de Proteína A con un soporte de intercambio iónico;

(f) permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte de intercambio iónico;

(g) lavar el soporte de intercambio iónico con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico;

(h) poner en contacto el flujo de lado a lado del intercambio iónico con una resina de hidroxiapatita;

(i) permitir que el anticuerpo se adsorba a la resina;

(j) lavar la resina con al menos un amortiguador de lavado de hidroxiapatita; y

(k) eluir el anticuerpo purificado de la resina con al menos un amortiguador de elución de hidroxiapatita que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

33. El método de conformidad con la reivindicación

31, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

34. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque al menos un amortiguador de elución de hidroxiapatita tiene un pH de 6.4 a 7.6.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque al menos un amortiguador de elución de hidroxiapatita contiene fosfato de sodio 3 mM o 5 mM.

36. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque al menos un amortiguador de elución de hidroxiapatita contiene cloruro de sodio 0.35 M o 1.0 M.

37. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque al menos un amortiguador de elución de hidroxiapatita tiene un pH de 6.8 ó 7.2.

38. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

39. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

40. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

41. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

42. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

44. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

45. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además la filtración del flujo de lado a lado del intercambio iónico antes de la aplicación a la resina de hidroxiapatita, con lo cual se reducen los contaminantes virales.

46. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende además someter el eluido de hidroxiapatita al menos a una ultrafiltración o diafiltración.

47. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

48. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado porque

comprende:

- (a) poner en contacto la preparación con un soporte de Proteína A;
- (b) permitiendo al anticuerpo se adsorba al soporte de Proteína A;
- (c) lavar el soporte de Proteína A y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de Proteína A;
- (d) eluye el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de Proteína A;
- (e) poner en contacto el eluido de Proteína A con un soporte de intercambio iónico;
- (f) permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte de intercambio iónico;
- (g) lavar el soporte de intercambio iónico con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico;
- (h) intercambiar el flujo de lado a lado del intercambio iónico en un amortiguador de carga que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.2 a 2.5 M;
- (i) poner en contacto el flujo de lado a lado del intercambio iónico con una resina de hidroxiapatita;
- (j) permitir que el anticuerpo fluya a través de la resina de hidroxiapatita; y
- (k) lavar la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de lavado de hidroxiapatita.

49. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

50. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

51. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el amortiguador de carga tiene un pH de 6.4 a 7.6.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el amortiguador de carga contiene fosfato de sodio 5 mM.

53. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el amortiguador de carga contiene cloruro de sodio 350 mM.

54. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el amortiguador de carga tiene un pH de 6.8.

55. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

56. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

57. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo es un anti-receptor de IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

58. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

59. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

60. El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

61. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

62. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque comprende además la filtración del flujo de lado a lado del intercambio iónico antes de la aplicación a la resina de hidroxiapatita, con lo cual se reducen los contaminantes virales.

63. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque comprende además someter el flujo de lado a lado de la hidroxiapatita a al menos una de ultrafiltración o diafiltración.

64. El método de conformidad con la reivindicación

48, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

65. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado porque comprende:

(a) equilibrar la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de equilibrio que comprende fosfato de sodio 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.01 a 2.0 M;

(b) poner en contacto la preparación de anticuerpo con la resina de hidroxiapatita bajo condiciones que permiten el enlace del monómero y los agregados de alto peso molecular;

(c) permitir que los agregados de alto peso molecular se enlacen más fuertemente que los monómeros de anticuerpo y, conforme continúa la carga, permitir que los agregados de alto peso molecular desplacen el monómero enlazado; y

(d) recolectar el monómero desplazado.

66. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

67. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

68. El método de conformidad con la reivindicación

65, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio tiene un pH de 6.2 a 8.0.

69. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene fosfato de sodio 2 mM o 5 mM.

70. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene cloruro de sodio 50 mM o 100 mM.

71. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio tiene un pH de 7.3.

72. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además hasta 200 mM de arginina o HEPES.

73. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además arginina 100 mM o 120 mM y HEPES 100 mM o 20 mM.

74. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

75. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

76. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

77. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

78. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

80. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

81.. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado el método porque comprende someter la preparación de anticuerpo a (a) cromatografía de afinidad de Proteína A, (b) cromatografía de intercambio iónico, y (c) cromatografía de hidroxiapatita,

en donde (i) la resina de hidroxiapatita es equilibrada con al menos un amortiguador de equilibrio que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.01 a 2.0 M;

(ii) la preparación de anticuerpo se pone en contacto con la resina de hidroxapatita bajo condiciones que permiten el enlace del monómero y de los agregados de alto peso molecular;

(iii) los agregados de alto peso molecular se dejan enlazar más fuertemente que los monómeros de anticuerpo, y como continúa la carga, se deja que los agregados de alto peso molecular se desplacen al monómero enlazado; y

(iv) los monómeros desplazados son recolectados.

82. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque la cromatografía de afinidad de Proteína A es realizada primeramente, y la cromatografía de hidroxapatita es realizada al final.

83. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

84. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

85. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio tiene un pH de 6.2 a 8.0.

86. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene fosfato de sodio 2 mM o 5 mM.

87. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene cloruro de sodio 100 mM o 50 M.

88. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque el amortiguador de elución o amortiguador de carga tiene un pH de 7.3.

89. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además arginina o HEPES hasta 200 mM.

90. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además arginina 100 mM o 120 mM y HEPES 100 mM o 20 mM.

91. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

92. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

93. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

94. El método de conformidad con la reivindicación

81, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

95. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

96. El método de conformidad con la reivindicación 95, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

97. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

98. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

99. Un método para purificar al menos un anticuerpo a partir de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular, caracterizado porque comprende:

(a) poner en contacto la preparación con un soporte de Proteína A;

(b) permitiendo al anticuerpo se adsorba al soporte de Proteína A;

(c) lavar el soporte de Proteína A y el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de lavado de Proteína A;

(d) eluir el anticuerpo adsorbido con al menos un amortiguador de elución de Proteína A;

(e) poner en contacto el eluido de Protefna A con un soporte de intercambio iónico;

(f) permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte de intercambio iónico;

(g) lavar el soporte de intercambio iónico con al menos un amortiguador de lavado de intercambio iónico;

(h) equilibrar la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de equilibrio que comprende fosfato de sodio de 1 a 20 mM y cloruro de sodio de 0.01 a 2.0 M;

(i) poner en contacto el flujo de lado a lado del intercambio iónico con la resina de hidroxiapatita bajo condiciones que permiten el enlace del monómero y de los agregados de alto peso molecular;

(j) permitir que los agregados de alto peso molecular se enlacen más fácilmente que los monómeros de anticuerpo, y conforme continúa la carga, permitir que los agregados de alto peso molecular desplacen el monómero enlazado;

(k) lavar la resina de hidroxiapatita con al menos un amortiguador de lavado de hidroxiapatita; y

(l) recolectar el monómero desplazado.

100. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 5% de agregados de alto peso molecular.

101. El método de conformidad con la reivindicación

99, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 1% de agregados de alto peso molecular.

102. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio tiene un pH de 6.2 a 8.0.

103. El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene fosfato de sodio 2 mM o 5 mM.

104. El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio contiene cloruro de sodio 100 mM o 50 M.

105. El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio tiene un pH de 7.3.

106. El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además arginina o HEPES hasta 200 mM.

107. El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque el amortiguador de equilibrio comprende además arginina 100 mM o 120 mM y HEPES 100 mM o 20 mM.

108. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

109. El método de conformidad con la reivindicación

99, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o un fragmento de los mismos.

110. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

111. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el anticuerpo tiene un pI básico.

112. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.

113. El método de conformidad con la reivindicación 112, caracterizado porque la resina es hidroxiapatita cerámica tipo I.

114. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

115. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque comprende además la filtración del flujo de lado a lado del intercambio iónico antes de la aplicación a la resina de hidroxiapatita, con lo cual se reducen los contaminantes virales.

116. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque comprende además someter el eluido de

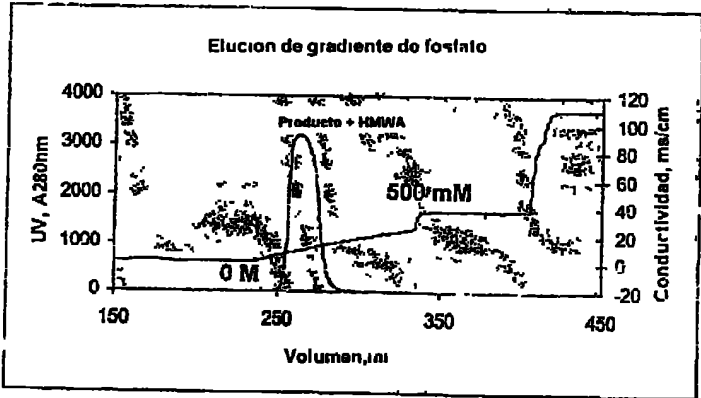
1/19

hidroxiapatita al menos a una de ultrafiltración o diafiltración.

117. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

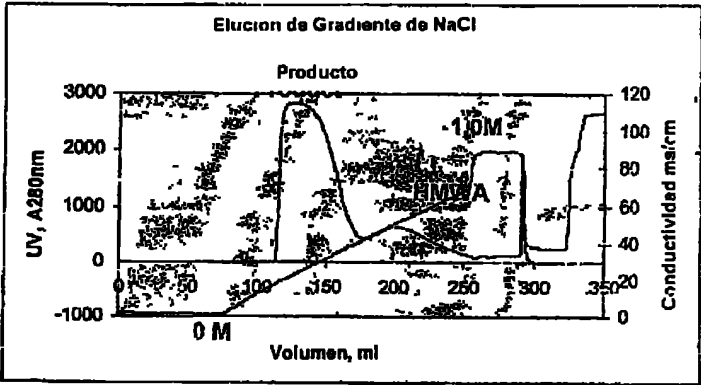
7/15

Figura 1



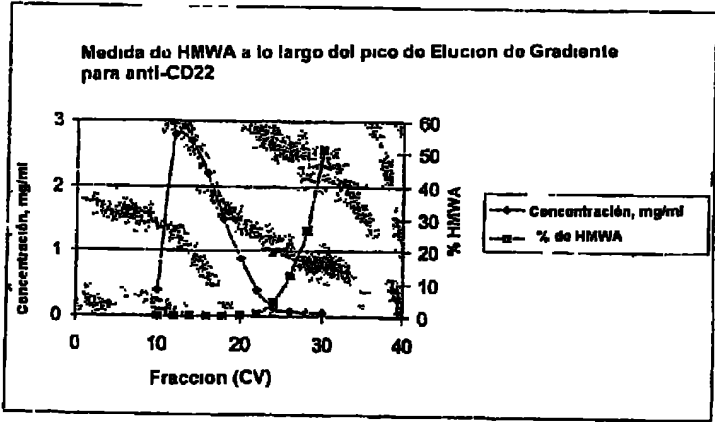
MS

Figura 2



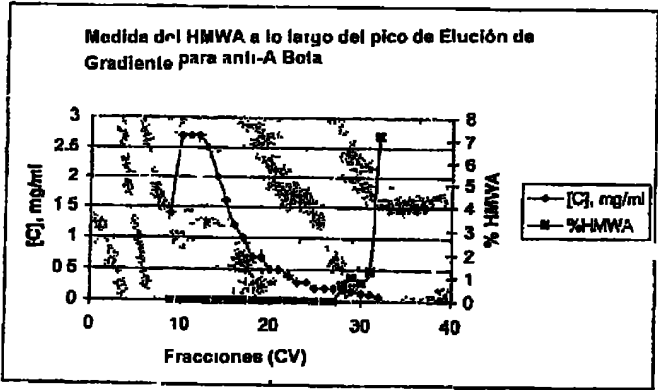
177

Figura 3



MB

Figura 4



115

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 33
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 116
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Camera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia