



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

DVN
NOV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-92447

54. TITULO: "UN MÉTODO DE CROMATOGRFÍA DE PARTICIÓN DÉBIL"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A01H 1/00

71. SOLICITANTE: WYETH

DOMICILIO: NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P.No.20.281

22. BOGOTA, D.C., 07 de Septiembre de 2007

CS

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-092447- -00000-0000

Fecha: 2007-09-07 15:55:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

icación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

11/10/07

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, New Jersey 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: BROWN, Paul; COFFMAN, Jon; GODAVARTI, Ranganathan; ISKRA, Tim; KELLEY, Brian D.; VUNNUM, Suresh; SUN, Shujun; YU, Tianning; BOOTH, James Edward y SWITZER, Mary Beth

Dirección: 94 Meadowood Road, Andover, MA 01845, Estados Unidos de América; 20 Sawmill Lane, Hampstead, NH 03841, Estados Unidos de América; 27 Dolores Drive, Burlington, MA 01803, Estados Unidos de América; 40 Kings Way, Unit 601c, Waltham, MA 02451, Estados Unidos de América; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155, Estados Unidos de América; 6 Oak Street, Burlington, MA 01803, Estados Unidos de América; 43 Peabody Drive, Brentwood, NH 03833, Estados Unidos de América; 4 Amherst Street, Arlington, MA 02474, Estados Unidos de América; 29 Flint Circle, Andover, MA 01810, Estados Unidos de América; 235 Farnum Street, North Andover, MA 01845, Estados Unidos de América; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Estadounidense, Hindú, Estadounidense, Estadounidense, Hindú, Estadounidense, Chino, Estadounidense, Estadounidense, respectivamente.

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/008919

Fecha 10-MAR-06

Publicación Internacional No. WO/2006/099308

Fecha 21-SEP-06

⑥

Título (54)

UN MÉTODO DE CROMATOGRFÍA DE PARTICIÓN DÉBIL

⑦

Clasificación Internacional (51)

A01H 1/00

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

11-MAR-05

(31) Número de Solicitud

60/660,437

⑨

Comprobante de pago No. 07-66631

Fecha 16-AGO-07

10

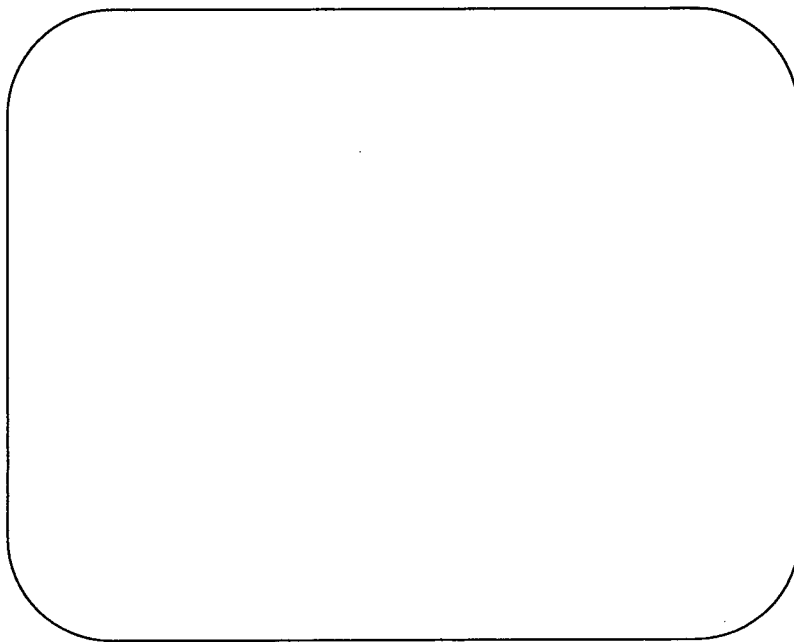
ANEXOS

10092

- ☒ 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
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ 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, dibujos)
- ☐ 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 acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-092447- -00000-0000

Fecha: 2007-09-07 15:55:54
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 66,631
FECHA : AGOSTO 16 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48717720	16/08/2007	73,144,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 September 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/099308 A2

(51) International Patent Classification:
A01H 1/00 (2006.01)

SWITZER, Mary, Beth [US/US]; 235 Farnum Street,
North Andover, MA 01845 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/008919

(74) Agents: LEW, Belinda et al.; Wilmer cutler Pickering
Hale and Dorr LLP, The Willard Office Building, 1455
Pennsylvania Avenue, Nw, Washington, DC 20004 (US).

(22) International Filing Date: 10 March 2006 (10.03.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:
60/660,437 11 March 2005 (11.03.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BROWN, Paul
[US/US]; 94 Medowood Road, Andover, MA 01845 (US).
COFFMAN, Jon [US/US]; 20 Sawmill Lane, Hampstead,
NH 03841 (US). GODAVARTI, Ranganathan [IN/US];
27 Dolores Drive, Burlington, MA 01803 (US). ISKRA,
Tim [US/US]; 40 Kings Way, Unit 601c, Waltham, MA
02451 (US). KELLEY, Brian, D. [US/US]; 108 Blakely
Road, Medford, MA 02155 (US). VUNNUM, Suresh
[IN/US]; 6 Oak Street, Burlington, MA 01803 (US). SUN,
Shujun [US/US]; 43 Peabody Drive, Brentwood, NH
03833 (US). YU, Tianning [CN/US]; 4 Amherst Street,
Arlington, MA 02474 (US). BOOTH, James, Edward
[US/US]; 29 Flint Circle, Andover, MA 01810 (US).

(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, IS, IT, LT, LU, LV, 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 "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A METHOD OF WEAK PARTITIONING CHROMATOGRAPHY

(57) Abstract: This invention relates to methods of using weak partitioning chromatography for the purification of a product from a load fluid containing one or more impurities. Further, the invention relates to methods of weak partitioning chromatography defined by operating conditions which cause a medium to bind least 1 mg of product per mL of medium, or alternatively, defined by a partition coefficient of at least 0.1.

A Method of Weak Partitioning Chromatography

Field of the Invention

[0001] The invention relates to methods of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities. In certain embodiments of the invention, the methods comprise passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium, and recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash. In other embodiments of the invention, the methods comprise passing the load through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1.

Background of the Invention

[0002] Within the biotechnology industry, the purification of proteins on a commercial scale is an important challenge to the development of recombinant proteins for therapeutic and diagnostic purposes. Problems related to yield, purity, and throughput plague the manufacturing sector. With the advent of recombinant protein technology, a protein of interest can be produced using cultured eukaryotic or prokaryotic host cell lines engineered to express a gene encoding the protein. What results from the host cell culturing process, however, is a mixture of the desired protein along with impurities that are either derived from the protein itself, such as protein variants, or from the host cell, such as host cell proteins. The use of the desired recombinant protein for pharmaceutical applications is contingent on being able to reliably recover adequate levels of the protein from these impurities.

[0003] Conventional protein purification methods are designed to separate the protein of interest from impurities based on differences in size, charge, solubility, and degree of hydrophobicity. Such methods include chromatographic methods such as affinity chromatography, ion exchange chromatography, size exclusion chromatography, hydrophobic interaction chromatography, immobilized metal affinity chromatography, and hydroxyapatite chromatography. These methods often employ a separation medium that can be designed to selectively adhere either the protein of interest or the impurities. In the bind-elute mode, the desired protein selectively binds to the separation medium and is differentially eluted from the medium by different solvents. In the flow-through mode, the impurities specifically bind to the separation medium while the protein of interest does not, thus allowing the recovery of the desired protein in the "flow-through."

[0004] Current methods for the purification of proteins, such as antibodies, include two or more chromatographic steps. For example, the first step in the protein purification protocol often involves an affinity chromatography step that utilizes a specific interaction between the protein of interest and an immobilized capture reagent. Protein A adsorbents are particularly useful for affinity capture of proteins, such as antibodies, which contain an Fc region. However, drawbacks to using Protein A chromatography for protein purification include leakage of the Protein A capture agent, leading to contamination of the eluted protein product. Additionally, affinity capture does not separate protein variants, such as aggregated forms of the protein, from the protein of interest.

[0005] Researchers have used bind-elute methods, flow-through methods, and displacement methods in efforts to recover proteins free from impurities resulting from both the culturing process and from possible prior steps in the purification process itself. Examples of groups using a bind-elute step as a typical second step to purifying proteins after an affinity capture step include: US Patent 4,983,722, describing a bind-elute ion exchange method of reducing Protein A from a mixture; US Patent 5,429,746, describing a bind-elute hydrophobic interaction chromatography method for purifying IgG antibody from a mixture including Protein A impurities; and US Patent 5,644,036, describing a three-step process for obtaining a purified IgG antibody preparation comprising a Protein A step, a bind-elute ion exchange step, and a size exclusion step. Other groups have used a flow-through step after the affinity chromatography step. For example, PCT publication WO 04/076485 describes a method for removing leaked Protein A from an antibody purified by a Protein A chromatography step followed by a flow-through ion exchange step. PCT publication WO 03/059935 describes a method for purifying a protein in a sample comprising subjecting the sample to a flow-through hydroxyapatite chromatography step following an affinity chromatography step.

[0006] Other groups have used a single polishing-step purification scheme to avoid the problems associated with prior purification steps. For instance, US Patent 6,177,548 describes a single-step flow-through ion exchange method for removing aggregates from a biological sample where the pH of the sample is adjusted to 0.2 logs below the isoelectric point of the biological sample. US Patent 5,451,662 describes a single-step bind-elute ion exchange method where the pH of the crude protein mixture is adjusted to a point between the ranges of isoelectric points of the protein fractions to be separated. PCT publication WO 05/044856 describes a single-step displacement method for removal of high molecular weight aggregates from antibody preparations using hydroxyapatite chromatography.

[0007] None of the conventional bind-elute or flow-through methods in the prior art, however, is able to meet the needs of the biotechnology industry in terms of all the requirements of throughput, yield, and product purity. Bind-elute methods and displacement methods are limited by, among other factors, the capacity limit of the separation medium for the desired protein. Flow-through methods, on the other hand, do allow for higher load challenges than bind-elute methods but are limited by the capacity of the separation medium for the impurities. With flow-through methods, no substantial binding of the product to the column occurs; any substantial product binding is seen as negatively impacting product recovery. There is still a need for methods of recovering purified proteins at high throughput that meet the requirements for purity and yield necessary for therapeutic and diagnostic applications. In addition, commercial manufacturing processes add the needs for reliable, robust, and cost-effective purification schemes.

Summary of the Invention

[0008] The present invention relates to methods of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of product per mL of medium and recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash. In other embodiments, the operating conditions cause the medium to bind at least 5 mg of product per mL of medium. In another embodiment, the operating conditions cause the medium to bind at least 10 mg of product per mL of medium. In other embodiments, the operating conditions cause the medium to bind at least 20, 30, 40, 50, or 60 mg of product per mL of medium.

[0009] The present invention also relates to methods of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1 and recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash. In one embodiment, the partition coefficient is in the range of about 0.2 to about 20.0. In another embodiment, the partition coefficient is in the range of about 0.2 to about 10.0. In another embodiment, the partition coefficient is in the range of about 1.0 to about 5.0. In another embodiment, the partition coefficient is in the range of about 0.5 to about 5.0. In an additional embodiment, the partition coefficient is in the range of about 0.5 to about 1.5.

[0010] The present invention also relates to methods of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of product per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20, and recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

[0011] The invention also provides for identifying, in a screening step, the operating conditions that cause the medium to bind at least 1 mg product per mL of medium or alternatively, are defined by a partition coefficient of at least 0.1. The screening step can employ batch binding studies or column binding studies, such as gradient elution studies or isocratic elution studies.

[0012] Operating conditions include pH levels, ionic strengths, salt concentrations, excipient concentrations (such as phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations), and counterligand levels (such as imidazole concentrations), depending on the selection of medium.

[0013] The medium can be any type of chromatographic resin or separation medium, including a charged ion exchange medium, such as an anion exchange medium or a cation exchange medium, a hydrophobic interaction chromatography resin, a hydroxyapatite resin, or an immobilized metal affinity chromatography resin.

[0014] Purified products that can be recovered using the invention include fusion proteins, Fc-containing proteins, immunoconjugates, cytokines, interleukins, hormones, and therapeutic enzymes.

[0015] Impurities that can be removed using the invention include host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, Protein A, and viruses.

[0016] In one embodiment, the medium removes at least 99.9% of the impurities in the load fluid including host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, and Protein A.

[0017] In another embodiment, the concentration of product variants in the purified product is no more than about 2%.

[0018] In additional embodiments, the load onto the medium may be at a load challenge of at least 500 mg or at least 1000 mg of product per mL of medium.

[0019] In one aspect of the invention, a purified product is recovered from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a charged ion exchange medium at operating conditions comprising pH levels and ionic strengths which

cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium or alternatively, at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1.

[0020] In another aspect of the invention, a purified product is recovered from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a hydrophobic interaction chromatography resin at operating conditions comprising pH levels, ionic strengths, and salt concentrations which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium or alternatively, at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1.

[0021] In another aspect of the invention, a purified product is recovered from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through a hydroxyapatite chromatography resin at operating conditions comprising pH levels, ionic strengths, phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, HEPES concentrations, and imidazole concentrations which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium or alternatively, at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1.

[0022] In yet another aspect of the invention, a purified product is recovered from a load fluid including one or more impurities by passing the load fluid through an immobilized metal affinity chromatography resin at operating conditions comprising counterligand levels and pH levels which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium or alternatively, at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1.

[0023] The methods of the invention can be optionally combined with one or more purification steps. The optional step(s) can be performed either prior to or following the practice of the inventive method. For example, the methods of the invention can optionally be combined with a Protein A chromatography step as an initial step.

[0024] In one embodiment of the invention, a product-containing fluid is eluted from a Protein A column using an elution buffer of low ionic strength; the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 20mM of the ionic strength of the product-containing fluid, resulting in the load fluid; and the load fluid is passed through an anion exchange medium under the operating conditions of the invention.

[0025] In some embodiments, the elution buffer comprises molecules with a charged cationic group with a pKa of 6.5-10. In other embodiments, the elution buffer further comprises molecules with a charged anionic group with a pKa of 2-5. In certain

embodiments, the elution buffer comprises molecules which are zwitterions at pHs between 7 and 9.

[0026] The invention also provides for purified products, including purified proteins and antibodies, prepared by the methods of the invention.

[0027] Additional objects and advantages of the invention will be set forth in part in the description which follows, and in part will be obvious from the description, or may be learned by practice of the invention. The objects and advantages of the invention will be realized and attained by means of the elements and combinations particularly pointed out in the appended claims.

[0028] It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention, as claimed.

[0029] The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute part of this specification, and together with the description, serve to explain the principles of the invention.

Brief Description of the Figures

[0030] Figure 1 shows (A) the relationship between a partition coefficient and a product adsorption isotherm; and (B) adsorption isotherms for product binding to resin, for three modes of operation: bind-elute mode, weak partitioning mode, and flow-through mode.

[0031] Figure 2 shows (A) the partitioning regions for three modes of operation in ion exchange chromatography: bind-elute mode, weak partitioning mode, and flow-through mode; and (B) the partitioning regions for three modes of operation in hydroxyapatite.

[0032] Figure 3 shows schematic chromatograms for three modes of operation: bind-elute mode, weak partitioning mode, and flow-through mode.

[0033] Figure 4 shows a comparison between weak partitioning and flow-through chromatograms.

[0034] Figure 5 shows (A) typical contaminant removal profiles as a function of K_p ; and (B) recovery as a function of load challenge and K_p .

[0035] Figure 6 shows typical progression of weak partitioning chromatography step development, including 1) high throughput screen to determine K_p , 2) low load challenge runs, 3) high challenge capacity runs, and 4) optimal weak partitioning chromatography runs.

[0036] Figure 7 shows a contour plot of K_p vs. pH and the total chloride concentration from the low concentration dataset, as described in Experiment 1.1.

[0037] Figure 8 shows Protein A removal as a function of the partition coefficient, K_p , as described in Experiment 1.1. The log removal value increases with K_p . Flow-through mode is indicated by the dashed box with "FT", while weak partitioning mode is indicated by the dashed box with "WP."

[0038] Figure 9 shows a contour plot of $\log_{10}K_p$ vs. pH and the log of the total chloride concentration, as described in Experiment 2.1.

[0039] Figure 10 shows (A) for Mab-AAB, host cell protein breakthrough profiles as a function of K_p in ion exchange chromatography; and (B) for Mab-AAB, Protein A breakthrough as a function of K_p in ion exchange chromatography.

[0040] Figure 11 shows for Mab-MYA, the optimum operating window for weak partitioning chromatography in hydroxyapatite. The optimum K_p in this example is between 1.5 and 20.

[0041] Figure 12 shows for Mab-A5T4, the optimum operating window for weak partitioning chromatography in hydroxyapatite. The optimum K_p in this example is between 2 and 20.

[0042] Figure 13 shows for Mab-MYO, the optimum operating window for weak partitioning chromatography in hydroxyapatite. The optimum K_p in this example is between 5 and 20.

Detailed Description of the Invention

A. Definitions

[0043] In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

[0044] The term "flow-through mode" refers to a product preparation separation technique in which at least one product contained in the preparation is intended to flow through a chromatographic resin or medium, while at least one potential contaminant or impurity binds to the chromatographic resin or medium. Generally, the product partition coefficient for flow-through mode is less than 0.1 and bound product concentration is < 1 mg/mL. The "flow-through mode" is an isocratic operation.

[0045] The term "bind-elute mode" refers to a product preparation separation technique in which at least one product contained in the preparation binds to a chromatographic resin or medium. Generally, the product partition coefficient for bind-elute

mode is greater than 20 and the bound product concentrations are between 1 - 20 mg/mL. The bound product in this mode is eluted during the elution phase.

[0046] The term "weak partitioning mode" refers to a product preparation separation technique in which at least one product contained in the preparation, and at least one contaminant or impurity, both bind to a chromatographic resin or medium. The binding of product in weak partitioning mode is at least 1 mg of product per mL of chromatographic resin or medium. Generally, the product partition coefficient for weak partitioning mode is at least 0.1. The "weak partitioning mode" is an isocratic operation.

[0047] The term "partition coefficient" (K_p) refers to the equilibrium ratio of the concentration of product absorbed to the resin (Q) to the concentration of product in the solution (c), under specified conditions of pH and solution composition. The partition coefficient K_p is also related to the product adsorption isotherms as shown in Figure 1. The partition coefficient K_p corresponds to the slope of the product adsorption isotherm at very low solution concentrations. It is related to the maximum capacity as follows:

$$K_p = \frac{Q}{C} = \frac{Q_{\max}}{k_d}$$

where $Q_{\max}$ is to maximum capacity of the resin for the product, and k_d is the dissociation constant for 'resin - product' interaction. The partition coefficient is typically measured with a batch binding technique, but other techniques, such as isocratic chromatography, can be used.

[0048] The term "bound product" (Q) refers to the amount of product which binds to the resin when in equilibrium with a feedstream.

[0049] The term "antibody" refers to any immunoglobulin or fragment thereof, and encompasses any polypeptide comprising an antigen-binding site. The term includes, but is not limited to, polyclonal, monoclonal, monospecific, polyspecific, non-specific, humanized, human, single-chain, chimeric, synthetic, recombinant, hybrid, mutated, grafted, and *in vitro* generated antibodies. The term "antibody" also includes antibody fragments such as Fab, $F(ab')_2$, Fv, scFv, Fd, dAb, and other antibody fragments that retain antigen-binding function. Typically, such fragments would comprise an antigen-binding domain.

[0050] In certain embodiments of the invention, the antibody is one which comprises a C_H2/C_H3 region and therefore is amenable to purification by Protein A chromatography. The term " C_H2/C_H3 region" refers to those amino acid residues in the Fc region of an immunoglobulin molecule which interact with Protein A. In some embodiments, the

C_H2/C_H3 region comprises an intact C_H2 region followed by an intact C_H3 region, and in other embodiments, comprises a Fc region of an immunoglobulin. Examples of C_H2/C_H region-containing proteins include antibodies, immunoadhesions and fusion proteins comprising a protein of interest fused to, or conjugated with, a C_H2/C_H3 region.

[0051] The term "load" refers to any load material containing the product, either derived from clarified cell culture or fermentation conditioned medium, or a partially purified intermediate derived from a chromatography step. The term "load fluid" refers to a liquid containing the load material, for passing through a medium under the operating conditions of the invention.

[0052] The term "impurity" refers to any foreign or objectionable molecule, including a biological macromolecule such as a DNA, an RNA, or a protein, other than the protein of interest being purified that is also present in a sample of the protein of interest being purified. Impurities include, for example, protein variants, such as aggregated proteins, high molecular weight species, low molecular weight species and fragments, and deamidated species; other proteins from host cells that secrete the protein being purified (host cell proteins); proteins that are part of an absorbent used for affinity chromatography that may leach into a sample during prior purification steps, such as Protein A; endotoxins; and viruses.

[0053] The term "essentially isocratic wash" refers to a solution which varies only slightly from the load fluid in terms of composition or pH.

[0054] The term "column effluent" refers to the liquid exiting the medium or column during the load cycle, or in the period that the load is being applied.

[0055] The term "load challenge" refers to the total mass of product loaded onto the column in the load cycle of a chromatography step or applied to the resin in batch binding, measured in units of mass of product per unit volume of resin.

[0056] The term "log removal value" (LRV) refers to the log(base 10) of the ratio of the mass of impurity in the load of a purification step to the mass of impurity in the product pool.

[0057] The term "isocratic chromatography" refers to the operation of a chromatographic column with a solvent that does not change strength during the period of interest.

B. Description of the Method

[0058] The present invention provides methods for recovering purified products from a load fluid containing one or more impurities. The invention has application to the large-scale preparation of proteins for therapeutic and diagnostic purposes.

1. Weak partitioning mode

[0059] Applicants have surprisingly found that by operating in a chromatographic mode residing in the region between conventional bind-elute and flow-through chromatography modes, a high degree of impurity reduction, as well as high product load challenge and product recovery, can be obtained. Applicants have named this intermediate product binding mode, the "weak partitioning mode."

[0060] In weak partitioning mode, a load fluid containing a product of interest and one or more impurities is passed through a chromatographic medium, with both the product and the impurities binding to the medium. However, the impurities bind more tightly to the medium than the product and as loading continues, unbound product passes through the medium and is recovered from the column effluent. The medium is optionally subsequently washed under isocratic conditions to recover additional weakly bound product from the medium and the purified product from any essentially isocratic wash is pooled with the purified product from the column effluent during the load cycle.

[0061] In accordance with the invention, weak partitioning mode is defined by operating conditions which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium. In one embodiment, the operating conditions cause the medium to bind at least 5 mg of product per mL of medium. In another embodiment, the operating conditions cause the medium to bind at least 10 mg of product per mL of medium. In another embodiment, the operating conditions cause the medium to bind at least 20 mg of product per mL of medium.

[0062] In certain embodiments of the invention, the total product mass bound to the medium is at least 10% of the total product mass loaded onto the medium. In some embodiments, the total product mass bound to the medium is at least 20% of the total product mass loaded onto the medium. In other embodiments, the total product mass bound to the medium is at least 30% of the total product mass loaded onto the medium.

[0063] In accordance with the invention, weak partitioning mode is also defined by a partition coefficient of at least 0.1. In some embodiments, operating in weak partitioning mode comprises operating under conditions defined by a partition coefficient in the range of about 0.2 to about 20.0. In certain embodiments, operating in weak partitioning mode comprises operating under conditions defined by a partition coefficient in the range of about

0.2 to about 10.0. In other embodiments, operating in weak partitioning mode comprises operating under conditions defined by a partition coefficient in the range of about 1.0 to about 5.0. In other embodiments, operating in weak partitioning mode comprises operating under conditions defined by a partition coefficient in the range of about 0.5 to about 5.0. In yet other embodiments, operating in weak partitioning mode comprises operating under conditions defined by a partition coefficient in the range of about 0.5 to about 1.5.

[0064] At least one embodiment of the present invention provides weak partitioning mode operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of product per mL of medium, and which are defined by a partition coefficient of 0.3 to 20.

[0065] Figure 1 shows the product adsorption isotherms for the bind-elute, flow-through, and weak partitioning modes, with product binding for weak partitioning mode being clearly intermediate in comparison to bind-elute and flow-through modes. Because the value of the product partition coefficient (K_p) is the ratio of the concentration of the adsorbed product to the concentration of the product in solution, the K_p values for weak partitioning mode are also intermediate to the values for bind-elute and flow-through modes.

[0066] Figure 2A depicts the partitioning regions for bind-elute, weak partitioning, and flow-through modes as a function of ionic strength, showing that K_{imp} is higher in weak partitioning mode than in flow-through mode. Under the more stringent binding conditions of weak partitioning mode, a higher product capacity can be achieved – higher than flow-through mode, as impurities are more strongly bound, and higher than bind-elute mode, as the product binds very weakly in comparison to impurities and does not take up the majority of the resin capacity. The impurity partition coefficient (K_{imp}) is higher at more stringent binding conditions, resulting in lower concentrations of residual impurities in the product pool of weak partitioning mode compared to the product pool of flow-through mode. The flow-through, weak partitioning and bind-elute regions in hydroxyapatite, as a function of phosphate and NaCl concentration, are shown in Figure 2B.

[0067] Table A summarizes the differences in characteristics between the three modes of binding: bind-elute (B-E), weak partitioning (WP), and flow-through (FT).

Table A Characteristics of FT/WP/B-E modes			
	FT	WP	B-E
K_p	< 0.1	0.1 – 20	>20
Load challenge limitation	Impurities 10–50 mg Prod/mL (typical) but actually dependent on load purity	Impurities 50– 500 mg Prod/mL (typical) but actually dependent on load purity	Product + impurities < 100 mg Prod/mL
Load Vol	Moderate, for dilute impurities 10 – 20 CVs	Very high, for dilute impurities up to 50 CVs	Lower, as the product binds in addition to impurities 5 – 20 CVs
[Product] in load eluate	Equal to load concentration through much of load	Initial lag, then equal to load concentration through much of load	<5% of load concentration
Residual [Impurity]	Low	Very low	Dependent on elution conditions, pool volume and capacity.
Product bound (Q)	< 1 mg/mL	< 10 - 20 mg/mL	> 10 – 20 mg/mL
Operating region	Relatively broad range of conditions	Modest window of operation between FT and B-E modes	Stringent binding conditions for load, broad range of elution conditions
Mobile phase(s)	Isocratic	Isocratic	Change in buffer composition after load which causes elution.

[0068] Weak partitioning mode can also be distinguished from bind-elute and flow-through modes by their chromatograms, as shown in Figure 3. At first, the chromatograms for flow-through and weak partitioning modes may seem quite similar – the product is recovered in the column effluent and wash fractions, under isocratic conditions. However, subtle, but meaningful distinctions exist in the chromatograms which can be used to distinguish these modes, as shown in Figure 4. There is a delay in the initial breakthrough profile (> 0.1 column volumes or CV) for weak partitioning mode compared to flow-through mode. There is a slower washout profile in weak partitioning mode. A small strip peak containing product may be present (which corresponds to the resin still binding 10 – 50% of the load product concentration after the wash stage), which can be recovered from the resin by applying a 1 – 5 CV wash after the load under isocratic conditions subsequent to recovery of the column effluent during the load cycle.

[0069] Figure 5A shows the general trends in contaminant LRV for various levels of product partition coefficient values. Contaminant LRVs are relatively low at K_p conditions corresponding to flow-through operations. Operating under conditions of increasing K_p significantly increases LRVs in the column effluent fractions prior to contaminant breakthrough. As shown in the examples, operating at higher K_p values improves the

contaminant LRVs by as much as 2 logs from those corresponding to the standard flow-through conditions.

[0070] Increasing K_p typically increases both the product as well as contaminant binding to the resin. The stronger binding of the contaminant at higher K_p leads to a greater LRV in the column effluent fractions prior to contaminant breakthrough. However, the load challenge at the point of contaminant breakthrough decreases with increasing K_p as the product begins to compete with the contaminant for the binding sites on the resin, as schematically represented in Figure 5A by the high K_p curve. The weak partitioning region therefore corresponds to an operating window that balances the improvement in contaminant LRV with column capacity requirements for a given separation.

[0071] The upper K_p limit for weak partitioning chromatography is also dependent on the column load challenge as shown in Figure 5B. The partition coefficient has no impact on product recovery at values bordering flow-through conditions. The product recovery begins to drop at high K_p values where the isocratic wash conditions are not effective at washing the bound product off the column in a reasonable number of wash volumes. The extent of product loss due to ineffective washout is sensitive to load challenge, as well as the nature and proportion of contaminant in the load. Thus, the lower limit of the WP region is defined by requirements of contaminant removal, while the upper limit for a given load challenge is defined by constraints of product recovery or capacity.

[0072] In one or more embodiments of the invention, optimal weak partitioning conditions may be identified using the following sequence of experiments, as shown in Figure 6:

- (i) Perform a HTS screen (or standard batch binding experiments) to determine product partition coefficients K_p as a function of operating conditions. Identify operating window corresponding to the weak partitioning region ($0.1 < K_p < 20$) from these experiments.
- (ii) Preferably, after identifying the weak partitioning region, one can perform scouting runs on a small scale column at a load challenge similar to those used for standard flow-through operation (approximately 50 mg/mL). One can further fine-tune the weak partitioning operating window based on contaminant removal and product recovery values from these experiments.
- (iii) More preferably, one can then generate contaminant breakthrough data for a few K_p conditions within the weak partitioning region. Based on these results, select an

optimum partition coefficient in the weak partitioning region that provides the highest removal of contaminants at an acceptable load challenge.

- (iv) One can then most preferably perform weak partitioning chromatography runs under optimal K_p conditions and further fine-tune the load challenge and wash volumes as needed to obtain optimal recovery and contaminant removal.

[0073] One of skill in the art could use these guidelines or a variation thereof to easily define a weak partitioning chromatography step that provides enhanced contaminant removal at comparable or higher load challenges than standard flow-through or bind/elute modes of column operation. The general framework discussed above can, with minor adjustments if any, be applied to develop a purification step in an ion exchange, hydrophobic interaction, hydroxyapatite, or multi-mode system that combines elements of any or all of these interactions.

2. Separation techniques

[0074] Weak partitioning mode may be used in conjunction with any chromatographic resin or medium for separation of a product from impurities. In one embodiment, the medium is a charged ion exchange medium. Ion exchange is a form of chromatography that separates according to net charge. Separation of molecules occurs as a result of the competition between the charged product of interest and counterions for oppositely charged ligand groups on the ion exchange medium. Binding interactions between the product and an ion exchange medium depend on the net charge of the product. Net charge is dependent on the pH and ionic strength of the medium, which affects the different charge characteristics of amino acids and other components on the exposed surface of the product molecule(s) of interest.

[0075] Ion exchange resins that may be used in the invention include anion exchange resins and cation exchange resins. Anionic exchange resins may employ substituents such as diethylaminoethyl (DEAE), trimethylaminoethyl (TMAE), quaternary aminoethyl (QAE) and quaternary amine (Q) groups. Cationic exchange may employ substituents such as carboxymethyl (CM), sulfoethyl (SE), sulfopropyl (SP), phosphate (P) and sulfonate (S). Cellulosic ion exchange resins such as DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 and CM-52 are available from Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. Sephadex-based and cross-linked ion exchangers are also known. For example, DEAE-, QAE-, CM-, and SP-Sephadex, and DEAE-, Q-, CM- and S-Sepharose, and Sepharose are all available from Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Further, both DEAE and CM derivatized ethylene glycol-

methacrylate copolymer such as TOYOPEARLTM DEAE-650S or M and TOYOPEARLTM CM-650S or M are available from Toso Haas Co., Philadelphia, PA.

[0076] In certain embodiments of the invention, weak partitioning mode is used with a hydrophobic interaction chromatography (HIC) resin for product purification. HIC is a technique for separating molecules based on hydrophobicity. Generally, sample molecules in a high salt buffer are loaded onto the HIC resin. The salt in the buffer interacts with water molecules to reduce the solvation of the molecules in solution, thereby exposing hydrophobic regions in the sample molecules which are consequently absorbed by the HIC medium. The more hydrophobic the molecule, the less salt needed to promote binding. Binding interactions between the product molecules and a HIC medium thus depend on conditions such as pH, ionic strength, and salt concentrations of the medium.

[0077] Various commercially available HIC resins that can be used in the invention include resins comprising a base matrix (e.g., cross-linked agarose or synthetic copolymer material) to which hydrophobic ligands (e.g., alkyl or aryl groups) are coupled. Examples include Phenyl SEPHAROSETM 6 FAST FLOWTM (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Phenyl SEPHAROSETM High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Octyl SEPHAROSETM High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); FractogelTM EMD Propyl or FRACTOGELTM EMD Phenyl (E. Merck, Germany); MACRO-PREPTM Methyl or MACRO-PREPTM t-Butyl Supports (Bio-Rad, CA); WP HI-Propyl (C₃)TM (J. T. Baker, NJ); and TOYOPEARLTM ether, phenyl or butyl (TosoHaas, PA).

[0078] In other embodiments of the invention, weak partitioning mode is used with hydroxyapatite chromatography for product purification. Hydroxyapatite chromatography is a technique that utilizes an insoluble hydroxylated calcium phosphate of the formula $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, as both the matrix and the ligand. Functional groups consist of pairs of positively charged calcium ions (C-sites) and clusters of negatively charged phosphate groups (P-sites). Binding interactions between the product and the hydroxyapatite medium depend on conditions such as the pH, ionic strength, and excipient concentrations, such as phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations of the medium. Various hydroxyapatite chromatographic resins are available commercially and can be used in the invention.

[0079] In further embodiments of the invention, weak partitioning mode is used with an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resin for product purification. IMAC is based on the interaction between chelated transition metal ions immobilized on the resin and the imidazole side chains of histidine residues on the tagged product of interest.

Separation of molecules occurs as a result of competition between the tagged product of interest and counterligands for metal groups on the IMAC resin. Binding interactions between the product and metal-charged IMAC medium depend on conditions such as counterligand levels, such as imidazole concentrations, and ionic strength of the medium. Various IMAC resins are available commercially and can be used in the invention.

3. Products for purification

[0080] The invention can be used for the commercial-scale purification of various products of interest, including naturally occurring proteins, fusion proteins, Fc-containing proteins, immunoconjugates, cytokines, interleukins, hormones, and therapeutic enzymes. In one embodiment, the protein undergoing purification may comprise one or more constant antibody immunoglobulin domain(s). In one embodiment, the protein may also comprise a single or multiple variable antibody immunoglobulin domain(s). In another embodiment, the Fc-containing protein may comprise an antibody. The proteins can be derived from various sources, including cultured recombinant prokaryotic or eukaryotic host cell lines.

[0081] The antibody preparations of the invention can be isolated from a number of sources including, but not limited to, serum of immunized animals, ascites fluid, hybridoma or myeloma supernatants, conditioned media derived from culturing a recombinant cell line that expresses the antibody molecule and from all cell extracts of antibody-producing cells. In one embodiment of the invention, antibodies from conditioned cell culture media of a variety of antibody producing recombinant cell lines are purified. Although one may expect some variation from cell line to cell line and among the various antibody products, based on the disclosure herein, it is well within the purview of one of ordinary skill in this art to adapt the invention herein to a particular combination of antibody protein and producing cell line.

[0082] For purposes of illustration only, this invention was applied to the purification of several antibodies of the IgG isotype. More specifically, this invention was applied to purification of a humanized, anti-A beta monoclonal antibody, an anti-GDF8 antibody, and a humanized, anti-IL-13 monoclonal antibody.

4. Loading conditions and capacities

[0083] Before loading the fluid containing the product and impurities onto the medium, it may be necessary to identify the region of weak partitioning by finding the operating conditions which cause the medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium. In one embodiment, the operating conditions found cause the medium to bind at least 5 mg of product per mL of medium. In another embodiment, the operating conditions

found cause the medium to bind at least 10 mg of product per mL of medium. In other embodiments, the operating conditions found cause the medium to bind at least 20 mg of product per mL of medium. Alternatively, the weak partitioning region is identified by finding the operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1. In certain embodiments, the operating conditions found are defined by a partition coefficient in the range of about 0.2 to about 20.0. In other embodiments, the operating conditions found are defined by a partition coefficient in the range of about 0.2 to about 10.0. In yet other embodiments, the operating conditions found are defined by a partition coefficient in the range of about 1.0 to about 5.0, in the range of about 0.5 to about 5.0, or in the range of about 0.5 to about 1.5. In additional embodiments, the weak partitioning region is identified by finding the operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of product per mL of medium and which is defined by a partition coefficient of 0.3 to 20.

[0084] One skilled in the art will recognize that the appropriate operating conditions will depend on the choice of medium selected for purification of the product. In certain embodiments, the operating conditions comprise pH levels and ionic strengths. In other embodiments, the operating conditions further comprise salt concentrations. In yet other embodiments, the operating conditions further comprise excipient levels, such as phosphate concentrations and calcium concentrations. In some embodiments, the operating conditions comprise counterligand levels, such as imidazole concentrations, and pH levels.

[0085] A screening step can be used to identify the operating conditions for weak partitioning mode. Such a screening step could include batch binding studies or column binding studies. Column binding studies could include gradient elution studies or isocratic elution studies. For example, one skilled in the art can determine which buffer or salt is appropriate for the particular protein being purified and for the operating conditions that are being identified. The optimal concentration of the selected buffer or salt can then be determined by, for example, running a gradient of the selected buffer or salt through a column to which a load fluid comprising the product to be purified and the impurities has been applied. Fractions of the effluent of the column can be collected and analyzed to determine the concentration of buffer or salt at which product binding is at least 1 mg of product per mL of medium or alternatively, at which the partition coefficient for the product is at least 0.1. In certain embodiments of the invention, the partition coefficient is measured between 1 and 10 mg/mL load challenge with a phase ratio (volume of liquid to volume of resin) of three to six in a batch binding experiment.

[0086] Once the operating conditions are determined, the conditions of the load fluid and/or medium can be adjusted accordingly. For example, the medium can be equilibrated by washing it with a solution that will bring it to the necessary operating conditions of weak partitioning mode. The load fluid may also be buffer exchanged into an appropriate buffer or load buffer in preparation for weak partitioning mode. The load buffer can be the same or a different buffer as the equilibration buffer.

[0087] In one embodiment, the ionic strength of the load fluid is no more than 100 mM. In another embodiment, the ionic strength of the load fluid is no more than 50 mM. In another embodiment, the ionic strength of the load fluid is no more than 25 mM. In yet another embodiment, the ionic strength of the load fluid is no more than 10 mM.

[0088] The load fluid may be passed through a separation medium that is packed in a bed column, packed in a fluidized/expanded bed column containing the solid phase matrix, and/or in a batch format where the solid phase matrix is mixed with the load fluid for a certain time. After the load fluid is passed through the medium, the medium is optionally washed with a volume of essentially isocratic wash. Purified product can be obtained from any essentially isocratic wash and pooled with the purified product from the column effluent during the load cycle. After the optional wash step, the medium can optionally be stripped and regenerated. This procedure is typically performed regularly to minimize the buildup of impurities on the surface of the solid phase and/or to sterilize the medium to avoid contamination of the product with microorganisms.

[0089] High load concentrations and load volumes are possible with weak partitioning mode. In one embodiment, the concentration of product in the load fluid is at least 1 mg of product per mL of load fluid, in another embodiment, the concentration of product in the load fluid is at least 5 mg of product per mL of load fluid, in another embodiment, at least 50 mg of product per mL of load fluid, and in another embodiment, at least 100 mg of product per mL of load fluid. Purified product can be recovered from up to 50 CVs of load fluid passed through the medium.

[0090] High load challenges are also possible with weak partitioning mode. In one embodiment, the load onto the medium may be at a load challenge of at least 10 mg of product per mL of medium. In other embodiments, the loading of the product onto the medium is at least 50 mg of product per mL of medium. In certain embodiments, the loading of the product onto the medium is at least 100 mg of product per mL of medium. In other embodiments, the load onto the medium may be at a load challenge of at least 500 mg of

product per mL of medium. In yet other embodiments, the load onto the medium may be at a load challenge of at least 1000 mg of product per mL of medium.

5. Removal of impurities

[0091] Weak partitioning mode has been shown to be useful for removing all types of impurities from product preparations, including host cell proteins, nucleic acids, product variants, including aggregated product and high molecular weight species, endotoxins, viruses, and Protein A contaminants from prior purification steps.

[0092] In one embodiment of the invention, the concentration of host cell proteins present in the purified product is no more than about 500 ng host cell proteins per mg of product. In other embodiments, the concentration of host cell proteins can be reduced to no more than 250 ng per mg of product, and in other embodiments, to no more than 100 ng per mg of product. In certain embodiments, the log removal value of host cell proteins is at least 1.0, in other embodiments, the log removal value of host cell proteins is at least 2.0, and in other embodiments, the log removal value of host cell proteins is at least 3.0.

[0093] In one embodiment of the invention, the concentration of Protein A present in the purified product is no more than about 100 ng Protein A per mg of product. In some embodiments, the concentration of Protein A can be reduced to no more than 50 ng per mg of product, and in other embodiments, to no more than 10 ng per mg of product. In certain embodiments, the log removal value of Protein A is at least 1.0, and in other embodiments, the log removal value of Protein A is at least 2.0, and in other embodiments, the log removal value of Protein A is at least 3.0.

[0094] In another embodiment of the invention, viral impurities are removed from the purified product. In certain embodiments, the log removal value of viruses is greater than 1.0, in other embodiments, greater than 2.0, and in other embodiments, greater than 3.0.

[0095] In some embodiments of the invention, nucleic acid impurities are removed from the purified product. In certain embodiments, the amount of nucleic acids present in the purified product can be reduced to no more than 1 ng nucleic acids per mg of product.

[0096] In additional embodiments, the concentration of protein variants in the purified product is no more than about 10%. In some embodiments, the concentration of protein variants can be reduced to no more than about 5%, in some embodiments, to no more than 2%, and in some embodiments, to no more than 0.5%.

[0097] Under the stringent binding conditions of weak partitioning mode, the separation medium removes at least 90% of host cell protein, nucleic acid, protein variant,

endotoxin, and Protein A impurities. In some embodiments, the medium removes at least 99% of the impurities, and in other embodiments, the medium removes at least 99.9% of the impurities.

6. Additional optional steps

[0098] The purification method of the invention can be used in combination with other protein purification steps. In one embodiment of the invention, one or more steps preceding the weak partitioning step may be desirable to reduce the load challenge. In another embodiment of the invention, one or more purification steps following the weak partitioning step may be desirable to remove additional contaminants or impurities.

[0099] The weak partitioning purification procedure described may optionally be combined with other purification steps, including but not limited to, Protein A chromatography, affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, immobilized metal affinity chromatography, size exclusion chromatography, diafiltration, ultrafiltration, viral removal filtration, and/or ion exchange chromatography. The optional purification steps preceding and/or following the weak partitioning step may also be operated in weak partitioning mode, or in other modes, such as bind-elute mode or flow-through mode.

[0100] In one embodiment, prior to the weak partitioning purification step, the harvest media may optionally be initially purified by a Protein A chromatography step. For example, PROSEP-ATM (Millipore, U.K.), which consists of Protein A covalently coupled to controlled pore glass, can be employed. Other useful Protein A formulations include Protein A Sepharose FAST FLOWTM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), TOYOPEARLTM 650M Protein A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA), and MABSELECTTM columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

7. Zwitterionic buffers used in tandem with Protein A chromatography and ion exchange chromatography

[0101] In certain embodiments, a product-containing fluid is eluted from a Protein A column using an elution buffer of low ionic strength. The pH and conductivity of the product-containing fluid is then adjusted using a neutralization buffer, which results in no more than 20mM of the ionic strength of the product-containing fluid. The resulting load fluid is then passed through an anion exchange medium or hydroxyapatite medium operating under conditions of weak partitioning mode. In certain embodiments, the load fluid is passed through an anion exchange medium without the need for diafiltration. In some embodiments, the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 40mM of the ionic strength of the product-containing

fluid. In other embodiments, the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer that results in no more than 60mM of the ionic strength of the product-containing fluid. In yet other embodiments, the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer that results in no more than 80mM of the ionic strength of the product-containing fluid.

[0102] Buffers that can be used for elution from the Protein A column include buffers comprising molecules with a charged anionic group with a pKa of 2-5. Such elution buffers could further comprise molecules with a charged cationic group with a pKa of 6.5-10. In one embodiment, the elution buffer comprises molecules which are zwitterions at pHs between 4 and 9, such as glycine; 1,4-piperazinebis-(ethanesulfonic acid); glycylglycine; cyclopentanetetra-1,2,3,4-carboxylic acid; N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; 2-(N-morpholino)propane-sulfonic acid; N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropane sulfonic acid; N-tris(hydroxymethyl)methylglycine; glycnamide; N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine; N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminopropane sulfonic acid; or N-glycyl-glycine.

[0103] The elution of a Protein A column with a zwitterionic buffer provides the advantage of low ionic strength upon some degree of neutralization. The low ionic strength of the buffer does not adversely impact the operation of subsequent ion exchange columns, including hydroxyapatite columns. High levels of ionic strength will decrease the binding of impurities to ion exchange columns, which may decrease the overall efficiency of the purification. Lower ionic strength solutions are preferred for loads onto ion exchange columns, as the ionic strength can be raised easily with the addition of concentrated salt solutions; decreasing the ionic strength of solutions is not facile. Surprisingly, there exist buffers that have a low pKa that allow use at low pH levels useful in Protein A elution steps, but that also have a second pKa that allow use at higher pH levels useful in ion exchange chromatography; these buffers, if used at a proper second pH, have little effective charge during the operation of the ion exchange step subsequent to the Protein A step.

[0104] A zwitterionic buffer that has a pKa near that of the elution pH preferred for Protein A (between pH 2 and 5, preferably between 2.5 and 4.0) allows the buffer to be used to maintain the pH near the buffer's pI and to elute the column. Zwitterionic buffers that also have a pKa near that of the operation of a subsequent ion exchange column (pH 5.5 to 11) would allow the buffer to control the pH in this pH range as well as in the Protein A elution pH range. The use of a single compound for both elution of the Protein A column at low pH

and for maintenance of the higher pH useful in ion exchange chromatography simplifies the operation of both steps, and also simplifies the composition of the product pool after neutralization.

[0105] In a further embodiment of the invention, a zwitterionic buffer with pKa1 and pKa2 can elute a Protein A column at pH levels within one pH unit of pKa1. Further, if the Protein A pool is neutralized with a basic solution of the zwitterionic buffer to a second pH within one pH unit of pKa2, the zwitterionic buffer will be able to maintain the pH of the solution. If the second pH is below that of pKa2, the buffer remains zwitterionic and contributes little to the overall ionic strength of the solution. For example, a zwitterionic buffer with concentration x at a pH equal to the pKa2 will contribute to the overall ionic strength only $x/2$. A zwitterionic buffer with concentration x at 1 pH unit below the pKa2 of the buffer will have a ionic strength of one-tenth of x . This reduction in ionic strength is significantly useful for operation of ionic exchange chromatography.

[0106] The existence of buffers that have a pKa1 useful for elution of Protein A columns and a pKa2 useful for operation of ion exchange chromatography is not obvious, in that the pKa1 of these buffers is not commonly reported. Buffers are commonly used at pH levels near that of pKa2, and are not known by those skilled in the art of chromatography to be useful for elution from a Protein A column. Further, while the utility of these buffers for elution from Protein A chromatographic columns is not generally realized, it is also not realized that these zwitterionic buffers would have additional utility as buffers for ion exchange columns subsequent to Protein A columns because they contribute less ionic strength to the neutralized Protein A pool.

C. Examples

The following examples are offered for illustrative purposes only.

[0107] Examples are provided for three modes of chromatography (anion exchange, hydrophobic interaction, and hydroxyapatite), using three different monoclonal antibodies. Four separate series of experiments are described, each representing a different pairing of the chromatography mode and the monoclonal antibody to be purified. The initial screening studies are presented first, which determine the partition coefficient and/or the concentration of product bound to the resin under various solution conditions, thus defining the operating regions of weak partitioning (WP) and flow-through (FT) modes. Several column studies are then summarized, with data on product recovery and impurity removal. The product

recoveries are excellent for the WP column runs, and the impurity levels are lower than in the corresponding FT studies. The WP runs were conducted with higher load challenges to the resin than the FT studies.

[0108] The levels of Protein A residuals in the test samples were measured using a Protein A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The amount of high molecular weight aggregate was measured using an analytical size exclusion chromatography (SEC) assay. The levels of host cell proteins (HCPs) were measured using a HCP ELISA. All screening and column studies were conducted at room temperature.

Series 1 – Anion Exchange using TMAE-HiCap (M) and Mab-AAB

Experiment 1.1– High throughput screen to establish WP and FT conditions

[0109] A high throughput screen (HTS) was performed to identify the weak partitioning and flow-through conditions for Mab-AAB with TMAE-HiCap (M) medium. This screen varied the concentration of sodium chloride and pH to determine their effect on the extent of binding of MAB-AAB and process related impurities (Protein A and HCP) to the TMAE medium.

[0110] 50µL of TMAE HiCap medium was added to each well of a 96 well filter plate. Each well was equilibrated in solutions made up 50mM glycine and a variable amount of Tris buffer (depending upon the amount needed for neutralization to the pH specified in Table 1.1.1) and sodium chloride (specified in Table 1.1.2). The pH ranged from 7.6 to 9.0 and the sodium chloride ranged from 0mM to 80mM.

[0111] The buffer solutions used in each row were diluted on an automated pipetting system (Tecan 100 RST). The stock solution for the buffers were made from 500mM glycine acidified with HCl to pH 3.0, and subsequently neutralized with 2M Tris Base to the pH levels indicated in Table 1.1.1. This titration resulted in a level of Tris that depended upon the pH of the buffer. The buffer pH was measured at a 1 to 10 dilution of the stock buffer concentration, which corresponded to the dilution made by the automated pipetting system. As a result of the glycine acidification to pH 3.0, the buffer contributes about 10mM of ionic strength to the final solution. Two load challenges were made to the resin: 5mg/mL to measure the partition coefficient, K, and 122 mg/mL, to measure the capacity of the resin for removal of impurities and the bound product, Q, in equilibrium with a protein solution at a concentration approximately equal to the column load concentration.

Table 1.1.1: Buffer type and pH target in each well

All columns	
A	50mM Glycine, 8.8mM Tris, pH 7.6
B	50mM Glycine, 13.6mM Tris, pH 7.8
C	50mM Glycine, 16.0mM Tris, pH 8.0
D	50mM Glycine, 19.6mM Tris, pH 8.2
E	50mM Glycine, 28.4mM Tris, pH 8.4
F	50mM Glycine, 37.2mM Tris, pH 8.6
G	50mM Glycine, 64.0mM Tris, pH 8.8
H	50mM Glycine, 100mM Tris, pH 9.0

Table 1.1.2: NaCl levels (in mM) and protein challenges (mg/mL) in each well

All Rows	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
MAB-AAB (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

[0112] In the first stage of the HTS experiment, each well was equilibrated in the conditions of NaCl and pH as described in Tables 1.1.1 and 1.1.2 in a phase volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin). The plate was shaken for 20 minutes, allowing equilibrium to be reached. The solution was then removed by centrifuging the filter plate. This equilibration cycle was repeated three times.

[0113] In the second stage, the resin in each well was challenged with a concentrated MAb-AAB solution to 5 mg/mL of resin with a volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin) at the appropriate NaCl concentration and pH. A 36mg/mL solution of Mab-AAB in 1mM HEPES, 10mM NaCl, pH 7.0 spiked with 300ppm of Protein A was used as stock solution. The loaded plate was shaken for 20 minutes, allowing the resin and solution to equilibrate. The supernatant was removed from the filter plate by centrifugation and collected into a collection plate. The protein concentration in the supernatant in each well was determined by absorbance at A280nm.

[0114] In the third stage, resin was washed by adding solutions of the specified NaCl and pH conditions listed in Table 1.1.2. The supernatant was removed after shaking for 20 minutes. In the fourth stage, 2M NaCl was added to remove the remaining protein that was bound to the resin. The partition coefficients were calculated for each well using the mass eluted from stages 3 and 4 and the product concentration from stage 2, and are shown in Table 1.1.3. A contour plot of the log of the partition coefficient as a function of pH and chloride is shown in Figure 7.

Table 1.1.3: Partition Coefficients (K) for the 96 well HTS screen for MAB-AAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.22	0.32	0.35	0.17	0.24	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.17	0.16
B	0.37	0.36	0.38	0.25	0.24	0.08	0.28	0.26	0.22	0.24	0.18	0.16
C	0.63	0.48	0.47	0.27	0.15	0.20	0.31	0.28	0.26	0.20	0.23	0.16
D	1.24	1.12	0.68	0.36	0.30	0.17	0.42	0.39	0.34	0.23	0.23	0.18
E	3.24	1.89	1.05	0.59	0.35	0.15	0.68	0.58	0.41	0.29	0.21	0.18
F	8.37	3.37	1.56	0.61	0.31	0.32	0.87	0.74	0.51	0.32	0.25	0.21
G	18.36	9.49	3.16	0.82	0.49	0.34	0.91	0.88	0.69	0.39	0.24	0.20
H	125.73	23.79	6.58	1.23	0.58	0.43	1.18	1.02	0.78	0.42	0.27	0.24

[0115] As shown in Table 1.1.3, the K_p value can be used to describe regions where MAB-AAB binds to the TMAE medium with different strengths. These regions are more clearly visualized in Figure 7. The strength of MAB-AAB binding to TMAE medium can be manipulated by varying conditions of pH and chloride concentration into flow-through ($K < 0.1$), weak partitioning ($0.1 < K < 20$), and binding zones ($K \geq 20$).

[0116] The supernatant from the load stage of all wells from each zone were sampled and submitted for Protein A analysis. The assay results of these samples are summarized in Table 1.1.4. There is a region of pH and conductivity where the TMAE chromatography step provides very significant removal of Protein A with limited protein loss to the resin. This region was found to be closely correlated to the partition coefficient value, K_p, and not any specific pH or chloride concentration (see Figure 8).

Table 1.1.4 Protein A Log Removal Values (LRV) for MAB-AAB binding data from HTS screen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.11	1.89	2.12	1.85	1.22	1.00	1.63	1.02	1.00	0.92	0.85	1.02
B	2.79	2.37	2.42	1.96	1.23	1.13	1.77	1.81	1.22	0.85	0.94	1.52
C	>3.05	>3.03	2.74	2.16	1.37	1.11	2.25	2.15	1.96	1.16	1.06	0.95
D	>3.41	>2.98	>3.06	2.50	1.94	1.18	3.39	3.11	2.57	1.41	1.02	0.89
E	>2.87	>2.93	>3.01	>2.95	2.13	1.75	>3.09	3.27	3.09	1.66	1.89	0.99
F	>2.64	>2.89	>2.99	>3.11	2.29	1.82	>3.07	>3.11	>3.15	2.19	1.24	0.84
G	>2.33	>2.58	>2.89	>3.07	2.41	2.14	>3.09	>3.11	>3.14	2.80	1.46	0.85
H	>1.63	>2.36	>2.76	>3.01	2.86	2.37	>2.98	>3.05	>3.15	3.16	3.45	0.85

Experiment 1.2 – Column runs under flow-through conditions

[0117] The following experiment was performed in the flow-through (FT) mode, where the Mab-AAB interacts only very weakly with the column. Two runs were performed with load challenges of 110 mg/ml and 200 mg/ml of resin.

[0118] For all TMAE (HiCapM) anion exchange chromatography runs described in the Series 1 experiments, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 300 cm/hr

Equilibration 1 – 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

Equilibration 2 – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Post load wash – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Strip buffer - 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

Mabselect Protein A Chromatography

[0119] The culture containing the monoclonal antibody was purified at Pilot scale using a MabSelect column (2,389 mL) connected to a Millipore K-prime 400 chromatography system. A Mabselect Protein A column was equilibrated with 5 column volumes of 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.5 at a flow rate of 300 cm/hr. The column was then loaded at a load of approximately 40 mg product/ml resin. This was followed by a 5CV wash in 1M NaCl, 50mM Tris, pH 7.5 and a 5CV wash containing 10 mM Tris, 75mM NaCl, pH 7.5 wash. The column was then eluted using 50 mM glycine, 75mM NaCl, pH 3.0. The product pool was neutralized to pH 7.6 using 2M Tris pH 8.5. The neutralized peak had a chloride concentration of approximately 90mM.

TMAE HiCap (M) Chromatography

[0120] The neutralized Protein A pool was further purified over the TMAE step with the equilibration, load, and wash solutions at pH 7.5 with 50 mM Tris and 75 mM sodium chloride. 5 column volumes of wash were used. The column dimensions and load challenges for these two studies were: Run 1: 7.0 cm diameter x 20.6 cm bed height (volume – 793 mL) with a load concentration of 11.9 mg/mL, and Run 2: 7.0 cm diameter x 13 cm bed height (volume – 500 mL) with a load concentration of 17.6 mg/mL.

[0121] These load conditions were in the flow-through (FT) region (Table 1.2.1). Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp) and the bound product was determined by protein in the column strip by using UV absorbance. This method of determining the bound product typically underestimates the amount of product bound during the load due to isocratic elution of the product during the wash. The levels of Protein A, HCP and HMW in the load and product pool were measured, and the extent of removal

calculated. The results are presented in Table 1.2.1. There is poor removal of Protein A and HMW, and modest reduction in HCP levels.

Table 1.2.1: Removal of HCP, Protein A, and HMW under flow-through conditions

Run	Load Challenge (mg/mL)	Partition Coefficient (Kp)	Bound Product (mg/mL resin)	HCP (LRV)	Protein A (LRV)	HMW (Fold)	Recovery (%)
1	110	0.17	1.4	2.3	0.1	-	96
2	200	0.17	3.3	2.0	<0.1	1.5	96

* Impurity levels were 38.5 ppm ProA and 51,943 ppm HCP (Run 1), 8.8 ppm ProA and 25,398 ppm HCP (Run 2).

Experiment 1.3– Column runs under weak partitioning conditions (high product challenge)

TMAE (HiCap M) Anion exchange Chromatography

[0122] Several Mabselect Protein A runs were performed essentially as described in Experiment 1.2 to generate the load material for these runs. The partially purified antibody pool from the Protein A step was further purified over the TMAE column. The load to the TMAE column was in 50mM Tris, pH 8.2. The column diameter was 0.5 cm and the bed height was 10 cm bed height (volume – 2.0 mL). The column was challenged to a load of 500 mg/mL resin, with a load concentration of 27.7 mg/mL.

[0123] The column was equilibrated with 5 column volumes of a solution containing 50 mM Tris, 2M NaCl pH 7.5 followed by another equilibration step comprising a 50 mM Tris, pH 8.2 solution. The column was then loaded to 500 mg product/ml resin with the neutralized Protein A peak from the previous step and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction.

[0124] These load conditions are in the weak partitioning region. Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp), and product binding at high protein concentrations. At pH 8.2, and an approximate chloride content of 12 mM, the partition coefficient, Kp, is estimated to be 1.9 (from interpolation of the dataset from the HTS screen).

[0125] The levels of HCP and Protein A were measured in three fractions during the loading stage representing load challenges of approximately 250, 375, and 500 mg/ml of resin. The results from experiment 1.3 are presented in Table 1.3.1. These results demonstrate that very high product challenges can be achieved in weak partitioning mode, without breakthrough of impurities. Excellent reduction in both HCP and Protein A was

achieved, along with 50% reduction in HMW content. In comparison to the results for operation in the flow-through mode in Table 1.2.1, the removal of impurities was much better in the weak partitioning mode.

Table 1.3.1: Removal of HCP, Protein A and HMW for a 500mg/mL TMAE load challenge

	Early fraction (250 mg/ml)	Middle fraction (375 mg/ml)	Late fraction (500 mg/ml)	Final product pool (ppm)
Residual HCP ppm (ng/mg product)	< 7.6	< 7.6	< 7.6	< 7.6
HCP Log Removal Value (LRV)	> 3.5	> 3.5	> 3.5	> 3.5
Residual Protein A ppm (ng/mg product)	0.3	Not determined	0.1	0.6
ProA Log Removal Value (LRV)	2.9	Not determined	2.3	2.5
HMW	Not determined	Not determined	Not determined	2 fold removal

* The impurities in the load were 25,398 ppm of HCP, 99.5 ppm of Protein A, and 2.3% HMW.

Experiment 1.4 – Column runs under weak partitioning conditions (robustness studies)

[0126] To further confirm the performance of the TMAE column in the region of weak partitioning, several runs were designed varying the pH and NaCl concentration in the load to test process robustness. All runs were performed at a load challenge of 250 mg/ml resin. Several Mabselect Protein A runs were performed essentially as described in Experiment 1.2 to generate the load material for these runs. The only factor varied in those runs was the sodium chloride concentration in the Protein A elution, which was varied to match the NaCl concentration in the TMAE load for a particular experiment. The columns were equilibrated with Equil 2 buffers and washed with Wash buffers which had approximately the same pH and sodium chloride content of the load.

[0127] These load conditions are in the weak partitioning region. Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp). The runs are ranked by the partition coefficients listed in Table 1.4.1. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance, and ranges from 7.8 – 25.3 mg/mL. Protein A, HCP and HMW results from these experiments are also presented in Table 1.4.1. The removal of all impurities was found to be robust in operating ranges which cover 13.5-38.8 mM total chloride and pH 7.8 – 8.4.

Table 1.4.1: Process robustness studies on removal of HCP, Protein A, and HMW in weak partitioning mode

NaCl Concentration (mM)	Kp	Bound Product (mg/mL)	pH	HCP in Load (ppm)	Protein A in load (ppm)	HCP (LRV)	Protein A (LRV)	HMW (Fold)	Recovery (%)
38.8	0.26	9.4	7.8	26,391	493.5	3.7	1.8	2.0	92
13.5	0.41	7.9	7.8	12,821	69.2	3.3	>1.9	1.8	87
27.4	0.50	8	8.0	23,465	252	3.6	2.2	3.2	91
18.5	0.73	7.8	8.0	21,626	308	3.7	>3.2	2.9	90
23.5	0.80	9.5	8.1	18,004	343	3.2	>3.2	3.5	94
27.7	0.86	9.5	8.2	24,821	280	3.6	>3.2	2.6	99
18.5	1.48	10	8.2	17,669	252	3.7	>3.1	3.9	95
22.0	5.35	25.3	8.4	29,293	533	3.6	>2.9	2.3	90

* Impurity levels were 38.5 ppm ProA and 51,943 ppm HCP (Run 1), 8.8 ppm ProA and 25,398 ppm HCP (Run 2).

+ includes the Cl⁻ ion contribution from NaCl, buffers and titrants

Summary

[0128] From this study, it can be seen that Protein A removal (LRV) varies strongly with Kp, while HCP LRV is excellent at all the values of Kp at or above 0.26, but much reduced at Kp = 0.17 (under flow-through conditions). Host cell protein removal is over one log lower for flow-through conditions compared to weak partitioning conditions, even for a reduced load challenge. The bound product ranges from 7.8 - 25 mg/mL for these weak partitioning conditions on this combination of resin and monoclonal antibody. The partition coefficient appears to be optimal between 0.41 < Kp < 5.4. It does not appear to be optimal at Kp=0.17 and a bound product of 1.4 - 3.3 mg/mL, the conditions of Experiment 1.2.

Series 2- Anion Exchange using TMAE-HiCapM and Mab-IMA

Experiment 2.1- High throughput screening to establish WP and FT conditions

[0129] A high throughput screen (HTS) was performed to identify the weak partitioning and flow-through conditions for Mab-IMA with TMAE-HiCap (M) medium. This screen varied the concentration of sodium chloride and pH to determine their effect on the extent of binding of MAB-IMA and process related impurities (Protein A and HCP) to the TMAE medium. 100µL of TMAE HiCap medium was added to each well of a 96 well filter plate. Each well was equilibrated in solutions made up of 25mM buffer no more than 1 pH unit away from the buffer pKa (Table 2.1.1) and the appropriate level of sodium chloride (Table 2.1.2). The pH ranged from 7.00 to 8.75 and the sodium chloride concentration ranged from 1mM to 190mM.

[0130] All buffers were titrated to the target pH using 12M HCl. As a result of different buffering species required different levels of titrant, the chloride concentration varied from well to well depending on which buffer was used for that well. The amount of Cl⁻ needed to titrate the buffer to the target pH was calculated using the Henderson-Hasselbach equation and added to the total Cl⁻ contributed from both the NaCl and the amount in the load material. The calculated Cl⁻ level for each well in the experiment is listed in Table 2.1.3.

Table 2.1.1: Buffer type and pH target in each well

	All columns
A	Ethanolamine (pH = 8.75)
B	Tris (pH = 8.5)
C	Tris (pH = 8.25)
D	Tris (pH = 8.0)
E	Tris (pH = 7.75)
F	Tris (pH = 7.5)
G	Bis-Tris (pH = 7.25)
H	Bis-Tris (pH = 7.0)

Table 2.1.2: NaCl levels in each well (in mM)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
All rows	1	5	10	15	25	35	50	75	100	125	150	190

Table 2.1.3: Cl⁻ levels in each well (in mM)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	22	26	31	36	46	56	71	96	121	146	171	211
B	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
C	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200
D	15	19	24	29	39	49	64	89	114	139	164	204
E	18	22	27	32	42	52	67	92	117	142	167	207
F	21	25	30	35	45	55	70	95	120	145	170	210
G	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
H	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200

[0131] In the first stage of the HTS experiment, each well was equilibrated in the conditions of NaCl and pH as described in Tables 2.1.1 and 2.1.2 in a phase volume ratio of 3:1 (300uL solution: 100uL resin). The plate was shaken for 20 minutes, allowing

equilibrium to be reached. The solution was then removed by centrifuging the filter plate. This equilibration cycle was repeated three times.

[0132] In the second stage, the resin in each well was challenged with a concentrated MAb-IMA solution to 3 mg/mL of resin with a volume ratio of 3:1 (300uL solution:100uL resin) at the appropriate NaCl concentration and pH. A 30mg/mL solution of Mab-IMA in 1mM Mes, 15mM NaCl, pH 6.5 with 300ppm of Protein A was used as stock solution. The loaded plate was shaken for 20 minutes, allowing the resin and solution to equilibrate. The supernatant was removed from the filter plate by centrifugation and collected into a collection plate. The protein concentration in the supernatant in each well was determined by absorbance at A280nm. Any decrease in Protein A and/or HCP levels indicates a condition conducive to purification.

[0133] In the third stage, resin was washed by adding solutions of the specified NaCl and pH conditions listed in Table 2.1.2. The supernatant was removed after shaking for 20 minutes. In the fourth stage, 2M NaCl was added to remove the remaining protein that was bound to the resin. The partition coefficients were calculated for each well using the mass eluted from stages 3 & 4 and the product concentration from stage 2, and are shown in Table 2.1.4. A contour plot of the log of the partition coefficient as a function of pH and chloride is shown in Figure 9.

Table 2.1.4: Partition Coefficients (Kp) for the 96 well HTS screen for MAB-IMA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	34.5	20.2	11.4	7.2	3.5	1.8	0.8	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2
B	97.1	42.4	19.3	9.9	4.3	2.2	1.0	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2
C	14.8	9.4	5.8	4.2	2.0	1.1	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
D	1.8	1.6	1.3	1.0	0.7	0.5	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
E	0.7	0.7	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
F	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
G	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

[0134] As shown in Table 2.1.4, the Kp value can be used to describe regions where MAB-IMA binds to the TMAE medium with different strengths. These regions are more clearly visualized in Figure 9. The strength of MAb-IMA binding to TMAE medium can be manipulated by varying conditions of pH and chloride concentration into flow-through ($K_p \leq 0.1$), weak partitioning ($0.1 < K_p < 20$), and binding zones ($K_p \geq 20$).

[0135] The supernatant from the load stage of several wells from each zone were sampled and submitted for Protein A analysis. The load had 300 ppm of Protein A. The assay results of these samples are summarized in Table 2.1.5. There is a region of pH and

conductivity where the TMAE chromatography step provides very significant removal of Protein A with limited protein loss to the resin. This region is found to be closely correlated to the partition coefficient value, K_p , and not any specific pH or chloride concentration.

Table 2.1.5 Protein A residual levels and MAB-IMA binding data from HTS screen

pH	Cl ⁻ (mM)	K_p (predicted)	Protein A (ppm)
8.5	12	42.4	<28 -BLOQ
8.5	32	4.3	<7 -BLOQ
8.25	35	2.0	<5 -BLOQ
8.25	45	1.13	<4 -BLOQ
8.0	39	0.7	<4 -BLOQ
8.25	60	0.5	<4 -BLOQ
7.75	42	0.4	<4 -BLOQ
7.5	45	0.3	35
8.0	64	0.3	63
8.25	110	0.3	190
7.25	32	0.2	90
8.0	89	0.2	177
8.75	121	0.3	217
7.75	92	0.2	187
7.5	120	0.2	219
7.25	107	0.2	224

Predicted K_p values are derived from a response surface fit to the HTS screen, and subsequent prediction of the K_p based on this regression model.

Experiment 2.2 – Column runs under FT conditions using TMAE-HiCapM and Mab-IMA

[0136] The following experiment was performed in the flow-through (FT) mode, where the Mab-IMA interacts only very weakly with the column. Four runs were conducted, with product challenges of 109 – 275 mg/ml of resin.

TMAE (HiCap M) anion exchange chromatography

[0137] For all TMAE (HiCapM) anion exchange chromatography steps described in the Experiment 2 series, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 300 cm/hr

Equilibration 1 – 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 or 8.0 (5 column volumes)

Equilibration 2 – 75mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5 (runs 3 and 4 contained 50mM Glycine)

Post load wash – 75mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5 (runs 3 and 4 contained 50mM Glycine)

Strip buffer - 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 or 8.0 (5 column volumes)

[0138] Several Mabselect Protein A runs were performed essentially as described in Experiment 1.2 to generate the load material for these runs. The partially purified antibody pools from the previously described Protein A step were further purified over the anion exchange step in a flow-through (FT) mode. Column diameters ranged from 1.0 - 3.2 cm and the column heights were 7.2 - 8.5 cm.

[0139] The columns were equilibrated with 5 column volumes of a solution containing 50 mM Tris, 2M NaCl pH 7.5 followed by another equilibration step comprising a 50 mM Tris, pH 7.5 solution. The columns were then loaded to between 109mg/mL and 275mg/mL with the partially purified Protein A peak and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction.

[0140] These load conditions were in the flow-through (FT) region. The high throughput screen described in Experiment 2.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (Kp) under these conditions of pH and chloride concentration. The runs are ranked by the partition coefficients listed in Table 2.2.1. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance. This method of determining the amount of bound product typically underestimates the total amount of product bound due to isocratic elution of product in the wash. Protein A, HCP, HMW and LMW removal results from these experiments are also presented in Table 2.2.1. There is relatively poor and variable removal of HCP, and no removal of Protein A and product variants (HMW and LMW species).

Table 2.2.1: Removal of HCP, Protein A and HMW and LMW in FT mode

Kp	Product bound (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	Load Challenge (mg/mL)	ProA In load (ppm)	HCP In load (ppm)	HCP (LR V)	ProA (LRV)	HMW (fold)	LMW (fold)	Recovery (%)
0.1	0.5	6.5	83	150	ND	4166	1.8	ND	1	1.1	>95%
0.2	0.8	7.0	83	275	25	1575	0.6	<0.1	1	1	>95%
0.2	ND	7.3	83	109	24	3117	2.4	<0.1	1	1	>95%
0.3	0.3	7.5	83	167	ND	4572	1.8	ND	1	1	>95%

ND = Not determined

Experiment 2.3 – Column runs under weak partitioning conditions for Mab-IMA

[0141] The following column experiments were performed in the weak partitioning mode under conditions identified by the HTS screening (Experiment 2.1). Seven runs were performed over the TMAE column from partially purified Protein A pools.

TMAE HiCap (M) chromatography

[0142] The partially purified antibody from a Protein A step run essentially the same as previously described was further purified over the TMAE step under weak partitioning (WP) conditions of pH and chloride content as described below. Column diameters ranged from 0.5 to 3.2 cm and the column heights were 9.4-9.5 cm.

[0143] The columns were equilibrated with 5 column volumes of a solution containing 50 mM Tris, 2M NaCl pH 7.5 or 8.0 followed by another equilibration step comprising a 50mM glycine, 50 mM Tris, pH 7.5 or 8.0 solution. The columns were then loaded to between 124mg/mL and 303mg/mL with the partially purified Protein A peak and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction. The results from this experiment are presented in Table 2.3.1.

[0144] These load conditions are in the weak partitioning (WP) region. The high throughput screen described in Experiment 2.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (Kp). The runs are ranked by the partition coefficients listed in Table 2.3.1. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance. This method of determining the amount of bound product typically underestimates the total amount of product bound due to isocratic elution of product in the wash. Protein A, HCP, HMW and LMW results from these experiments are also presented in Table 2.2.1. There is consistent and high removal of HCP, excellent removal of Protein A, and valuable reduction of product variants (HMW and LMW species).

[0145] A comparison of the data presented in Tables 2.2.1 and 2.3.1 confirms that the removal of HCP, Protein A, HMW, and LMW under conditions of a flow-through mode (Kp values of ≤ 0.3) is much lower than what can be achieved under weak partitioning conditions (Kp values > 0.3), even when the load challenge exceeds 300 mg/mL.

Table 2.3.1: Removal of HCP, Protein A, HMW, and LMW under weak partitioning conditions.
ND = not determined

Kp	Product bound (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	Load Challenge (mg/mL)	ProA In load (ppm)	HCP In load (ppm)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (fold)	LMW (fold)	Recovery (%)
0.6	ND	7.5	14	303	72	754	1.9	1.6	1.3	1.5	>95%
0.7	ND	8.0	55	303	72	754	2.0	1.5	1.0	1.2	>95%
0.7	4	7.9	45	307	213	1852	2.6	2.4	ND	ND	>95%
1.0	5	8.1	45	302	222	1852	2.6	3.0	ND	ND	>95%
1.2	30	8.0	35	124	52	3320	2.8	>2.1	1.4	1.1	89%
1.7	ND	8.0	26	303	72	754	2.3	>2.6	1.1	1.8	>95%
1.7	9	8.1	31	310	ND	ND	ND	ND	ND	ND	90%
1.8	25	7.8	14	169	23	2462	3.0	>1.8	1.9	2.1	86%
5.2	9	8.0	17	303	72	754	2.0	>2.6	1.7	1.6	>95%
8.9	59	8.2	12	284	ND	ND	ND	ND	1.5	2.1	75%

Experiments 2.4: Performance of weak partitioning column runs at Pilot and Clinical manufacturing scale

[0146] The TMAE process step for the purification of Mab-IMA operated in the weak partitioning zone was scaled-up to the Pilot plant and clinical manufacturing. The culture containing the monoclonal antibody was first purified using a 3L or 5L MabSelect column in Pilot and a 28 L MabSelect column during clinical manufacturing. The MabSelect column was essentially operated as described in Experiment 1.2. The neutralized Protein A peak pools from these runs were further purified on a 1.5 L TMAE column in Pilot and a 7 L TMAE column in the clinical manufacturing facility. The results of three Pilot runs and nine clinical manufacturing runs are summarized in Tables 2.4.1 and 2.4.2, respectively. The step performance was consistent across the runs, with excellent reduction of HCP, Protein A, and good removal of product related HMW and LMW species. Product recovery was >87% in all runs. An estimate of the product bound to the resin during the Pilot runs was obtained from the product in the column strip, which ranged from 6 – 14 mg/mL of resin.

Table 2.4.1: Performance of Pilot Scale runs under Weak Partitioning conditions

	Kp	Product bound (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	Load Challenge (mg/mL)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (fold)	LMW (fold)	Recovery (%)
Run 1	1.7	14	8.1	31	253	3.4	>2.6	2.0	2.0	90
Run 2	1.7	13	8.1	31	184	>3.6	>2.6	1.0	3.0	88
Run 3	1.7	6	8.1	31	150	ND	>2.8	1.3	1.2	88

ND = not determined

Table 2.4.2: Performance of manufacturing scale runs under weak partitioning conditions

	Kp	Load Challenge (mg/mL)	Cl- (mM)	pH	HCP* (LRV)	ProA* (LRV)	HMW (fold)	LMW (fold)	Recovery (%)
Run 1	3.2	90	30	8.1	>2.2	≥0.8	2.5	3.0	90
Run 2	2.5	180	29	8.0	>2.2	≥0.0	1.9	1.5	93
Run 3	2.6	133	28	8.0	>2.3	≥1.0	2.5	1.8	95
Run 4	2.6	174	29	8.0	>2.2	≥1.0	2.5	1.2	94

Run 5	2.2	136	31	8.0	>2.0	≥0.9	2.3	1.7	102
Run 6	3.8	146	27	8.1	> 2.2	≥0.8	2.5	1.8	91
Run 7	2.0	118	28	7.9	> 2.2	≥1.0	1.6	1.6	96

* The HCP and Protein A levels in TMAE peak pool were below limit of quantitation.

Summary

[0147] HTS identified conditions for WP and FT operation. The FT mode provided only a modest reduction in HCP and LMW species, and no reduction in Protein A residuals or HMW species. Operation in the WP mode improves the removal of all impurities without sacrificing product yield. The process step was scaled up to the Pilot plant and operated consistently for three runs, with very high LRVs for HCP and Protein A, and good reductions in HMW and LMW species.

Series 3 – Anion Exchange using TMAE-HiCapM and Mab-AAB

Experiment 3.1 – High throughput screen to establish WP and FT conditions

[0148] Experiment 3.1 was performed using procedures as described in Experiment 1.1.

Experiment 3.2 – Column capacity runs under conditions corresponding to varying partition coefficients

[0149] Five chromatography experiments were performed under conditions corresponding to a range of partition coefficients identified by HTS screen (Experiment 3.1). The TMAE columns were loaded to a very high load challenge (>1000 g/L) to specifically highlight the superior performance of the AEX step under weak partitioning conditions.

[0150] The following conditions were used for the AEX runs performed in Series 3 (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 300 cm/hr

Equilibration 1 – 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

Equilibration 2 – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Post load wash – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Strip buffer - 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

[0151] The column was equilibrated with 5 column volumes of equilibration buffer 1 followed by 5 column volumes of equilibration 2 step. The column was then loaded to

between 940 and 2144 mg of product /ml of resin with the Protein A peak pool (refer to Series 1, Experiment 1.1) adjusted to the appropriate equilibration 2 buffer.

[0152] The column effluent fractions were collected and subsequently assayed for HCP and residual Protein A levels. The load conditions used in these experiments correspond to progressively increasing partition coefficients that span the flow-through and weak partitioning (WP) regions. The high throughput screen described in Experiment 3.1 provided estimates for the value of the partition coefficient (Kp). The bound product values in this example were calculated based on the product eluted in the strip. The results from these experiments are presented in Table 3.2.1 and Figures 10A and 10B.

Table 3.2.1 – Summary of results from very high load challenge experiments in the WP mode

	Partition Coefficient Kp	Operating conditions	Load Challenge mg/ml	Product bound mg/mL*	Recovery*
Run 1	0.1	Flow-through	1754	0	100
Run 2	0.23	Weak Partitioning	940	14.2	98.5
Run 3	0.8	Weak Partitioning	940	12.0	98.7
Run 4	0.8	Weak Partitioning	2144	23.0	98.9
Run 5	2.73	Weak Partitioning	960	12.6	98.7
Run 6	7	Weak Partitioning	1130	71.7	93.7

*Based on mass balance calculations.

[0153] The product bound value for the run corresponding to a Kp of 0.1 was near zero, as is expected for a typical flow-through operation. The product bound values for experiments performed in the weak partitioning region were > 12.0 mg/ml in all cases. In fact, the product bound value for the run corresponding to the Kp of 7 was as high as 71 mg/ml. The product recovery in the combined load eluate and wash fractions in all cases were, however, > 93%.

[0154] HCP and Protein A removal, as a function of load challenge, is presented in Figures 10A and 10B. As discussed earlier, the HCP removal increases significantly as conditions move from flow-through to weak partitioning. Operating under flow-through conditions provides approximately 1.5 logs of HCP clearance, while the HCP log removal values were as high as 3.8 logs at load challenges < 450 mg /ml of resin when operated at a Kp of 7 in the weak partitioning region. At a Kp of 0.8 in the weak partitioning region, 2.8 logs of HCP clearance was obtained for load challenges up to 1000 mg/ml of the resin, and > 3 logs of HCP clearance was obtained for up to a load challenge of 800 mg/ml of resin at a Kp of 2.7 in the weak partitioning region.

[0155] As in the case of HCP, Protein A removal increases significantly as we move from flow-through conditions to weak partitioning conditions. The results presented in Figures 10A and 10B also highlight the fact that increasing the K_p of operation from the flow-through to weak partitioning region increases both the HCP and Protein A log clearance values obtained prior to breakthrough of the contaminant, as well as the load challenge corresponding to the point of breakthrough. A further increase in K_p continues to increase the HCP and Protein A LRV prior to breakthrough of the contaminant. However, the point of breakthrough occurs at relatively lower load challenges as the bound product now competes with the contaminants for the binding sites. Nevertheless, the column capacity for the runs presented here were very high even for the high K_p run.

Summary

[0156] In this example it was shown that Protein A and HCP removal can be significantly improved by operating the AEX step under weak partitioning conditions and at load challenges in excess of 1000 mg/ml of resin. This example highlights one fundamental difference between weak partitioning chromatography and the standard operations under binding conditions. The weak partitioning conditions push the limits of product binding only up to a point where the contaminant clearance is significantly improved, while product recovery and load challenges remain high. The K_p values corresponding to binding conditions are > 20 in AEX; under these conditions the competitive effects between product and contaminant are very strong leading to reduced capacity as compared to weak partitioning chromatography.

Series 4—Hydrophobic Interaction using Phenyl Toyopearl and Mab-AAB

Experiment 4.1 - Batch binding studies to establish WP and FT conditions

[0157] Batch binding studies were conducted to identify the weak partitioning and flow-through conditions for Mab-AAB with Phenyl Toyopearl medium from Tosoh Biosciences. The salt modulating the strength of the product interaction with the resin is Na_2SO_4 , which was varied from 0.20 to 0.90M. The solutions were buffered to control at pH 7.5. 45 μm filter plates were used to incubate the resin with liquid and to decant the supernatant through centrifugation. Eight Tris/ Na_2SO_4 buffers were made with Na_2SO_4 at different concentrations (0.2 M to 0.9 M). Mab-AAB which was partially purified by Protein A chromatography was diluted into Tris/ Na_2SO_4 solution to a final of concentration of 0.87 mg/ml. 50 μl of resin was equilibrated with 300 μl of buffer and then the supernatant

decanted for each of the Tris/ Na₂SO₄ conditions; this equilibration was repeated three times. After equilibration, decanted resin was mixed with product at the same salt concentration and pH and incubated for 30 minutes with gentle shaking. The load challenge was 5.2 mg product /ml of resin for all conditions. A UV plate was then stacked at the bottom of the filter plate to collect the supernatant upon centrifugation. Subsequently, 300 ul of 50mM Tris, pH 7.5 buffer was applied to the resin to strip off bound product. Following a 20 minute incubation, the strip was collected in a separate UV plate through centrifugation. The concentration of the product in each fraction was measured by UV absorbance and the extinction coefficient for this MAb. The calculations were adjusted for a stage-to-stage carry over volume of 29 ul that was determined through a separate set of experiments. The experiment was repeated four times under each salt condition and an average partition coefficient is reported.

[0158] Table 4.2.1 summarizes the partition coefficients from this experiment. The highest concentrations of Na₂SO₄ caused strong product binding, while salt concentrations in the range of 0.40 – 0.55M represent weak partitioning conditions.

Experiment 4.2 – Column runs under weak partitioning, flow-through and binding conditions (high product challenge studies)

[0159] Column runs were performed under flow-through, weak partitioning and strong binding conditions. For all Phenyl Toyopearl hydrophobic interaction chromatography runs described in the Series 4 experiments, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Column dimension: diameter 0.5 cm, bed height 9.5 – 10.5 cm
Equilibration – 50 mM Tris, pH 7.5 with [Na₂SO₄] approximately equivalent to the load
Load – [Na₂SO₄] as specified below
Wash - [Na₂SO₄] equal to the load (exceptions noted below)
Strip - 50 mM Tris, pH 7.5

[0160] Two different loads were used: i) partially purified antibody pools from a Protein A step run essentially the same as those previously described or ii) more pure TMAE Q Sepharose FF product pools from FT mode operation.

Experiment 4.2.1 – Column runs using Protein A peak pool as load

[0161] The experiments discussed here were performed to highlight the superior performance of HIC under weak partitioning conditions. Column runs were performed under

varying salt concentrations to cover a range of partition coefficients that correspond to flow-through, weak partitioning and strong binding conditions. The batch binding screen described in Experiment 4.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (Kp). The columns were equilibrated with 5 column volumes of a solution containing 50 mM Tris, pH 7.5 and appropriate [Na2SO4] at specified concentration. The Protein A peak was first concentrated 10-fold, and subsequently diluted to 14.77 mg/ml in the appropriate salt concentration. Host cell protein (HCP) and residual Protein A levels in the load material were 30911 ppm and 17.1 ppm, respectively. All column runs were performed at a load challenge of 100 mg/ml of resin. The product was collected in the column effluent during the load cycle fraction. After product flow-through, ten column volumes of wash buffer at the same salt concentration as load were applied to the column, followed by five column volumes of a strip buffer containing 50mM Tris,pH 7.5. HCP and Protein A content in the load eluate and wash samples were subsequently analyzed by ELISA. The combined impurity level in both load eluate and wash fractions is reported in Table 4.2.1.

[0162] The runs are ranked by the partition coefficients. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance. This method of determining the bound product typically underestimates the amount of product bound during the load due to the gradual desorption of the product during the wash.

Table 4.2.1: Impurity removal in flow-through, weak partitioning and strong binding conditions

	Na2SO4 Conc	Partition Coefficient Kp	Operating window	Bound Product (mg/mL)	Product Recovery (%)	Protein A removal (fold)	HCP removal (Log)
Run 1	0.10 M	<0.1	Flow-Through	0.6	94	0.9	0.3
Run 2	0.20 M	<0.1	Flow-Through	1.3	93	0.8	0.4
Run 3	0.40 M	0.9	Weak Partitioning	2.8	94	1.7	1.0
Run 4	0.45 M	2.0	Weak Partitioning	3.0	93	1.5	0.9
Run 5	0.50 M	4.3	Weak Partitioning	3.8	92	2.5	N/A
Run 6	0.55 M	9.9	Weak Partitioning	5.0	93	3.4	1.1
Run 7	0.80 M	>100	Strong Binding	25	72	2.2	0.7
Run 8	0.90 M	>100	Strong Binding	34	67	1.1	0.4

(The partition coefficient Kp accounts for the phase volume ratio of 6 from 50 microliters of resin and 300 microliters of solution.)

[0163] As is evident from the data presented in Table 4.2.1, the performance of the HIC step improves significantly with respect to contaminant reduction as we move from flow-through conditions to weak partitioning conditions, while product recovery is comparable. A further increase in the operating salt concentration leads to partition coefficients that correspond to the strong binding conditions. It is once again clear from the

data presented in Table 4.2.1 that the HIC step performance deteriorates with respect to both contaminant reduction, as well as product recovery, as we move from weak partitioning to strong binding conditions. The optimum operating window for this separation therefore corresponds to that of weak partitioning chromatography. Under weak partitioning conditions, the HIC step provides 1 log reduction of HCP and a 3.4 fold reduction of Protein A. The bound product levels under the weak partitioning conditions, in this example, were between 2.8 – 5 mg/ml of the resin.

Experiment 4.2.2 – Column runs using Q-Sepharose peak pool as load

[0164] The Q Sepharose FF peak pool was used in these sets of experiments to highlight the fact that the performance of the HIC step under the optimum weak partitioning chromatography conditions can be further improved with a cleaner feedstock. The load material in this case contained 2880 ppm of HCP and was generated by purifying the Protein A peak pool on a Q-Sepharose FF column. Two experiments, one under weak partitioning conditions and the other under typical flow-through conditions, were conducted to compare the column performance with respect to impurity removal. The Q-Sepharose peak was diluted to 3.27 mg/ml at 550 mM Na₂SO₄ and loaded to the column to a load challenge of 100 mg/ml of resin for operation under weak partitioning conditions. The column was subsequently washed with 10 CVs of a buffer containing the same salt concentration as the load and stripped with 6CV of 50 mM Tris buffer, pH 7.5. The second experiment was conducted under flow-through conditions. The load was adjusted to 3.03 mg/ml in 200 Na₂SO₄ and loaded to the column to a load challenge of 90 mg/ml of resin. The column was then washed with 6CV of a buffer containing the same salt concentration as the load, and subsequently stripped with 6 CV of 50 mM Tris buffer, pH 7.5. In both runs, the flow-through and wash fractions were collected for recovery and impurity analysis. The results from these runs are reported in Table 4.2.2.

Table 4.2.2: Comparison of HIC weak partitioning results to flow-through results

Run	Na ₂ SO ₄ Conc	Partition Coefficient (Kp)	Operating mode	Load Challenge (mg/mL)	Bound Product (mg/mL)	Product Recovery	HCP LRV
1	0.55M	9.9	Weak Partitioning	100	3.0	94 %	>2
2	0.20M	<0.1	Flow-through	90	0.1	99 %	<0.5

[0165] The product recovery values under weak partitioning conditions were comparable to flow-through operations and were also independent of the feedstock used in these experiments. The performance of the steps with respect to HCP removal is

significantly higher under weak partitioning conditions as compared to flow-through operation.

[0166] HCP LRV across the HIC step with either feedstock was comparable under flow-through conditions (~ 0.4 – 0.5 LRV). However, the HCP LRV values for experiments performed under weak partitioning conditions increased from 1 LRV with the Protein A load material to greater than 2 LRV with load material purified through Protein A and Q Sepharose FF columns.

Summary

[0167] Another mode of chromatography (HIC) was shown to operate successfully in a weak partitioning mode. The performance of the HIC step under weak partitioning conditions was shown to be superior to both flow-through conditions, as well as to operations under tighter binding conditions, with respect to product recovery and HCP/Protein A removal. A high load challenge capacity of 100 mg/ml of resin was successfully processed under weak partitioning conditions, where > 3 mg/mL of product bound to the resin (even though the load concentration was 3.27 mg/mL). The partition coefficients corresponding to optimum weak partitioning conditions appear to be slightly higher than those for anion exchange chromatography.

Series 5– Hydroxyapatite using ceramic Hydroxyapatite Type I and Mab-MYA

Experiment 5.1 – High throughput screen to establish WP and FT conditions

[0168] A high throughput screen (HTS) was performed to identify the weak partitioning and flow-through conditions for Mab-MYA with ceramic hydroxyapatite medium. This screen varied the concentration of sodium chloride and sodium phosphate to determine their effect on the extent of binding of MAB-MYA to the hydroxyapatite medium.

[0169] 50µL of ceramic hydroxyapatite medium was added to 30 wells of a 96 well filter plate. Each well was equilibrated in solutions made up of the appropriate sodium chloride and sodium phosphate concentrations in a 100mM HEPES buffer containing 100mM arginine at pH 7.2. The concentrations of the two salts in the solution are shown in Tables 5.1.1 and 5.1.2. Each condition was performed in duplicate. The MAB-MYA load challenge in each of these wells was of 5.0 mg/mL of resin

Table 5.1.1: Sodium chloride levels in each well (in mM)

	1	2	3	4
A	50	200	50	200
B	750	50	750	50
C	50	380	50	380
D	500	760	500	760
E	50	1140	50	1140
F	200	200	200	200
G	350	200	350	200
H	700		700	

Table 5.1.2: Sodium phosphate levels in each well (in mM)

	1	2	3	4
A	5	20	5	20
B	5	30	5	30
C	8	30	8	30
D	8	30	8	30
E	10	30	10	30
F	10	50	10	50
G	10	100	10	100
H	10		10	

[0170] In the first stage of the HTS experiment, each well was equilibrated in the conditions of sodium chloride and sodium phosphate as described in Tables 5.1.1 and 5.1.2, in a phase volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin). The plate was shaken for 20 minutes, allowing equilibrium to be reached. The solution was then removed by centrifuging the filter plate. This equilibration cycle was repeated three times.

[0171] In the second stage, the resin in each well was challenged with a concentrated MAb-MYA solution to the appropriate protein load challenge with a volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin) at the appropriate sodium chloride and sodium phosphate concentration. A 7.0 mg/mL solution of Mab-MYA in 50 mM NaCl, 100 mM HEPES, 100 mM arginine, pH 7.2 was used as stock solution. The loaded plate was shaken for 20 minutes, allowing the resin and solution to equilibrate. The supernatant was removed from the filter plate by centrifugation and collected into a collection plate. The protein concentration in the supernatant in each well was determined by absorbance at A280nm.

[0172] In the third stage, resin was washed by adding solutions of the specified sodium chloride and sodium phosphate conditions listed in Tables 5.1.1 and 5.1.2. The supernatant was removed after shaking for 20 minutes.

[0173] In the fourth stage, a buffer comprised of 100mM sodium phosphate, 1M NaCl pH 7.2 was added to remove the remaining protein that was bound to the resin.

[0174] The partition coefficients were calculated for each well using the mass eluted from stage 4 and the product concentration from stage 2, and are shown in Table 5.1.3.

Table 5.1.3: Partition Coefficients (Kp) for the 96 well HTS screen for MAB-MYO

	1	2	3	4
A	49.3	2.3	50.5	2.4
B	3.5	6.0	4.1	6.0
C	31.6	0.4	34.7	0.3
D	2.9	0.1	3.3	0.1
E	28.1	0.0	28.3	0.0
F	7.2	0.5	7.7	0.4
G	3.5	0.0	3.1	0.0
H	1.1		1.1	

[0175] As shown in Table 5.1.3, the Kp value can be used to describe regions where MAB-MYA binds to the hydroxyapatite medium with different strengths. The strength of MAB-MYA binding to ceramic hydroxyapatite medium can be manipulated by varying conditions of chloride and phosphate concentration into flow-through ($K_p < 0.1$), weak partitioning ($0.1 < K_p < 20$), and binding zones ($K_p \geq 20$).

Experiment 5.2 – Column runs under WP conditions

[0176] The experiments discussed here were specifically performed to highlight the superior performance of the cHA step under weak partitioning conditions. The experiments were therefore performed under conditions corresponding to a range of partitioning coefficients identified by the HTS screen (Experiment 5.1). Twelve runs were conducted, with product load challenges of 100 mg/ml of resin.

Mabselect Protein A Chromatography

[0177] The culture containing the monoclonal antibody was purified using a MabSelect column. A Mabselect Protein A column was equilibrated with 5 column volumes of 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.5 at a flow rate of 300 cm/hr. The column was then loaded at a load of approximately 40 mg product/ml resin. This was followed by a 10CV

wash in 1M arginine, 50mM Tris, pH 7.5 and a 5CV wash containing 10 mM Tris, 75mM NaCl, pH 7.5 wash. The column was then eluted using 100mM arginine, 50mM NaCl, pH 3.0. The product pool was neutralized to pH 7.2 using 2M HEPES pH 8.0.

Ceramic Hydroxyapatite Chromatography

[0178] The partially purified antibody pools from the Protein A step were further purified over hydroxyapatite. The column diameter was 0.5 cm and the column height was 10 cm.

[0179] For all hydroxyapatite chromatography steps described in the Experiment 5 series, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 240 cm/hr	
Equilibration 1	300 mM sodium phosphate, 1.0M NaCl, pH 6.8 (3 column volumes)
Equilibration 2	5 – 30 mM sodium phosphate, 50 – 760 mM NaCl, 100mM Arg, 100mM HEPES pH 7.2 (5 column volumes)
Wash	5 - 30 mM sodium phosphate, 50 – 760 mM NaCl, 100mM Arg, 100mM HEPES pH 7.2 (5 – 10 column volumes)

[0180] The column was equilibrated with 5 column volumes of equilibration buffer 1 followed by another equilibration 2 step. The column was then loaded to 100 mg product/ml resin with the Protein A peak from the previous step (adjusted to the appropriate equilibration 2 buffer), and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction. The results from these experiments are presented in Table 5.2.1 and Figure 11.

[0181] These load conditions were in the flow-through, weak partitioning (WP) and binding regions. The high throughput screen described in Experiment 5.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (Kp) and the bound product (mg/mL of resin) under these conditions of chloride and phosphate concentration. The bound product was determined from the product breakthrough volumes from the column runs. HCP and Protein A results from these experiments are presented in Table 5.2.1 and Figure 11.

Table 5.2.1: Removal of HCP and Protein A under flow-through, weak partitioning and binding conditions

	Partition Coefficient Kp	Operating Mode	Phos	NaCl	Bound Product (mg/mL)	Product Recovery (%)	Protein A removal (fold)	Host Cell Protein (LRV)
--	--------------------------	----------------	------	------	-----------------------	----------------------	--------------------------	-------------------------

Run 1	0.0	Flow-through	30	760	0	93	0	0.58
Run 2	0.9	Weak Partitioning	30	200	3.0	96	NA	0.57
Run 3	1.1	Weak Partitioning	10	700	3.2	94	1.7	0.9
Run 4	1.7	Weak Partitioning	20	200	3.1	94	NA	0.83
Run 5	3.0	Weak Partitioning	8	500	3.0	100	1.9	1.3
Run 6	3.2	Weak Partitioning	10	350	3.6	94	2.1	1.5
Run 7	3.7	Weak Partitioning	5	750	3.3	99	2.4	1.2
Run 8	5.8	Weak Partitioning	30	50	10.7	95	2.1	1.2
Run 9	7.3	Weak Partitioning	10	200	10.2	94	2.4	1.2
Run 10	27.8	Strong Binding	10	50	16.3	91	2.1	1.2
Run 11	32.7	Strong Binding	8	50	21.6	86	2.4	1.4
Run 12	49.2	Strong Binding	5	50	24.6	79	2.1	1.6

[0182] It is evident from the data presented in Table 5.2.1 and Figure 11 that the performance of the cHA step improves significantly with respect to contaminant reduction as we move from flow-through conditions to weak partitioning conditions, while product recovery is comparable. Operating under conditions corresponding to a further increase in the partition coefficient (i.e., operating in the binding region) provides no additional benefit with respect to contaminant removal. However, product recovery across the step begins to drop under strong binding conditions. Thus, the optimum operating window for this separation corresponds to that of weak partitioning chromatography. Under these conditions, > 2 log reduction of Protein A and > 1.2 log reduction of host cell protein was obtained at a load challenge of 100 mg of product / ml of resin. Bound product levels under the weak partitioning conditions, in this example, were between 3.0-10.2 mg/mL of the resin.

Summary

[0183] A third mode of chromatography (hydroxyapatite) was shown to operate successfully in a weak partitioning mode. Protein A and HCP bind more tightly than the product antibody to ceramic resin, and are retained strongly under WP conditions. Higher values of K_p in the WP region are between 10 and 20 in some cases, which still provide good product recovery (> 90%). Lower levels of K_p give correspondingly higher recoveries.

[0184] In this example it was shown that the performance of the column step can be optimized primarily through the choice of partition coefficient used to run the column. The partition coefficient in hydroxyapatite is a complex function of pH, salt (type and concentration), phosphate, and buffer components. All of these variables in general have an impact on the performance of the column step. The approach presented here provides a simple means of relating the impact of changing any one of these variables on column performance. The unified 'partition coefficient' approach presented in this example opens up the possibility of operating in a wider operating space in this mode of chromatography than

has been done before. The weak partitioning conditions for optimum performance can easily be identified using the HTS methods described above.

Series 6– Hydroxyapatite using ceramic Hydroxyapatite Type I and Mab-A5T

Experiment 6.1 – High throughput screen to establish WP and FT conditions

[0185] A high throughput screen (HTS) was performed to identify the weak partitioning and flow-through conditions for Mab-A5T with ceramic hydroxyapatite medium. This screen varied pH, sodium chloride and sodium phosphate concentrations to determine their effect on the extent of binding of MAB-A5T to the hydroxyapatite medium.

[0186] 50μL of ceramic hydroxyapatite medium was added to 36 wells of a 96 well filter plate. Each well was equilibrated in solutions made up of the appropriate sodium chloride and sodium phosphate concentrations in a 50mM HEPES buffer containing 50mM arginine at either pH 7.0 or pH 8.0. The concentrations of the two salts in the solution are shown in Tables 6.1.1 and 6.1.2. The conditions shown in columns 1-3 were performed at pH 7.0, and columns 4-6 were performed at pH 8.0. The MAB-A5T load challenge in each of these wells was of 5.0 mg/mL of resin.

Table 6.1.1: Sodium chloride levels in each well (in mM)

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	50	400	400	50	400	400
B	50	50	400	50	50	400
C	50	50		50	50	
D	100	50		100	50	
E	100	100		100	100	
F	100	100		100	100	
G	400	100		400	100	
H	400	400		400	400	

Table 6.1.2: Sodium phosphate levels in each well (in mM)

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	2	32	8	2	32	8
B	8	2	32	8	2	32
C	32	8		32	8	
D	2	32		2	32	
E	8	2		8	2	
F	32	8		32	8	
G	2	32		2	32	
H	8	2		8	2	

[0187] In the first stage of the HTS experiment, each well was equilibrated in the conditions of sodium chloride, sodium phosphate and pH as described in Tables 6.1.1 and 6.1.2 in a phase volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin). The plate was shaken for 20 minutes, allowing equilibrium to be reached. The solution was then removed by centrifuging the filter plate. This equilibration cycle was repeated three times.

[0188] In the second stage, the resin in each well was challenged with a concentrated MAb-A5T solution to the appropriate protein load challenge with a volume ratio of 6:1 (300uL solution: 50uL resin) at the appropriate pH and sodium chloride and sodium phosphate concentration. A 6.9 mg/mL solution of Mab-A5T in 1mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0 was used as stock solution. The loaded plate was shaken for 20 minutes, allowing the resin and solution to equilibrate. The supernatant was removed from the filter plate by centrifugation and collected into a collection plate. The protein concentration in the supernatant in each well was determined by absorbance at A280nm.

[0189] In the third stage, resin was washed by adding solutions of the specified sodium chloride, sodium phosphate and pH conditions listed in Tables 6.1.1 and 6.1.2. The supernatant was removed after shaking for 20 minutes.

[0190] In the fourth stage, a buffer comprising 100mM sodium phosphate, 1M NaCl pH 7.2 was added to remove the remaining protein that was bound to the resin. The partition coefficients were calculated for each well using the mass eluted from stage 4 and the product concentration from stage 2, and are shown in Table 6.1.3.

Table 6.1.3: Partition Coefficients (Kp) for the HTS screen for MAB-A5T

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	142.7	0.1	1.6	50.2	0.0	0.3
B	90.6	144.3	0.1	9.9	44.7	0.0
C	12.1	84.5		1.0	13.7	
D	90.5	10.4		22.2	1.1	
E	27.5	94.1		4.3	21.9	
F	2.5	28.0		0.3	4.3	
G	15.1	2.1		2.2	0.4	
H	1.2	15.1		0.4	2.0	

[0191] As shown in Table 6.1.3, the Kp value can be used to identify regions where MAB-A5T binds to the hydroxyapatite medium with different strengths. The strength of MAB-A5T binding to ceramic hydroxyapatite medium can be manipulated by varying

conditions of NaCl, phosphate and pH into flow-through, weak partitioning, and binding zones.

Experiment 6.2 – Column runs under WP conditions

[0192] Experiments were performed to highlight the superior performance of the cHA step under weak partitioning conditions. The experiments were therefore performed under conditions corresponding to a range of partitioning coefficients identified by the HTS screen (Experiment 6.1). Eight runs were conducted, with product load challenges of 110 mg/ml of resin.

Mabselect Protein A Chromatography

[0193] The culture containing the monoclonal antibody was purified using a MabSelect column. A Mabselect Protein A column was equilibrated with 5 column volumes of 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.5 at a flow rate of 300 cm/hr. The column was then loaded at a load challenge of approximately 40 mg product/ml resin. This was followed by a 5CV wash in 1M NaCl, 50mM Tris, pH 7.5 and a 5CV wash containing 10 mM Tris, 75mM NaCl, pH 7.5 wash. The column was then eluted using 100mM arginine, 50mM NaCl, pH 3.0. The product pool was neutralized to pH 7.2 using 2M HEPES pH 8.0.

Ceramic Hydroxyapatite Chromatography

[0194] The partially purified antibody pools from the Protein A step were further purified over hydroxyapatite. The column diameter was 0.5 cm and the column height was 10 cm.

For all hydroxyapatite chromatography steps described in the Experiment 6 series, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 240 cm/hr	
Equilibration 1	300 mM sodium phosphate, 1.0M NaCl, pH 6.8 (3 column volumes)
Equilibration 2	2 – 32 mM sodium phosphate, 50 – 400 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 50 mM glycine, 10 mM HEPES, pH 7.0 (5 column volumes)
Wash	Same as Equilibration 2.

[0195] The column was equilibrated with 5 column volumes of equilibration buffer 1 followed by another equilibration 2 step. The column was then loaded to 110 mg product/ml resin with the Protein A peak from the previous step (adjusted to the appropriate equilibration 2 buffer), and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction. The results from these experiments are presented in Table 6.2.1 and Figure 12.

Table 6.2.1: Partition coefficients for MAB-A5T on cHA resin and the corresponding operating window.

	Partition Coefficient Kp	Product Bound mg/ml	Operating mode	Phos mM	NaCl mM	pH
Run 1	0.1	0	Flow-Through	32	400	7.0
Run 2	0.7	1.6	Weak Partitioning	32	170	7.0
Run 3	1.4	2.2	Weak Partitioning	32	120	7.0
Run 4	2.1	1.6	Weak Partitioning	2	400	7.0
Run 5	13.7	7.0	Weak Partitioning	8	50	8.0
Run 6	22	6.7	Weak Partitioning	2	100	8.0
Run 7	54	12.8	Strong Binding	2	60	8.0
Run 8	>100	16	Strong Binding	2	50	7.0

[0196] The operating conditions in these experiments correspond to the flow-through, weak partitioning (WP) region and binding regions. The HTS experiment described in Experiment 6.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (Kp) under these conditions of pH, chloride and phosphate concentrations. The runs in Table 6.2.1 are ranked by the partition coefficients. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance. This method of determining the bound product typically underestimates the amount of product bound during the load due to the gradual desorption of the product during the wash. HCP and product related HMW removal, as well as product recovery results from these experiments are presented in Figure 12.

[0197] It is clear from the data presented in Figure 12 that the performance of the cHA step improves significantly with respect to HCP and HMW reduction as we move from the flow-through conditions to the weak partitioning conditions, while product recovery is maintained at > 80%. Operating under conditions corresponding to a further increase in the partition coefficient (i.e., operating in the binding region) provides no additional benefit with respect to contaminant removal. However, the product recovery across the step begins to drop under strong binding conditions. Thus, the optimum operating window for this separation corresponds to that of weak partitioning chromatography. Under these conditions,

a 4-fold reduction of product related HMW species and >1.4 log reduction of HCP was obtained at a load challenge of 110 mg of product/ml of resin. The bound product levels under weak partitioning conditions, in this example, were between 1.6-6.7 mg/ml of the resin.

Summary

[0198] A second example was presented in hydroxyapatite where operating under weak partitioning chromatography was shown to provide improved performance with respect to HCP and HMW reduction and product recovery (> 80%). As in previous examples, the performance of the step was optimized primarily through the choice of partition coefficients used to run the column. The approach presented here provides a simple means of relating the impact of changing any one of several variables (pH, salt, phosphate, imidazole, glycine, HEPES, etc.,) to column performance. The weak partitioning conditions for optimum performance can easily be identified using the HTS methods described in this example. The approach presented here opens up the possibility of operating in a wider operating space in this mode of chromatography than has been done before. The optimal WP region in this example corresponds to partition coefficients between 2 and 20.

Series 7- Hydroxyapatite using Ceramic Hydroxyapatite Type I and Mab-MYO

Experiment 7.1 – High throughput screen to establish FT, WP and strong binding conditions

[0199] A high throughput screen (HTS) was performed to identify flow-through, weak partitioning and binding conditions for Mab-MYO with ceramic hydroxyapatite medium. This screen varied the concentration of pH, arginine/glycine, HEPES, sodium phosphate and sodium chloride to determine their effect on the extent of binding of MAB-MYO to the hydroxyapatite medium.

[0200] The HTS procedures used in this example were similar those described in Series 5 and Series 6 and are not discussed here. Predicted K_p values derived from a response surface fit to the HTS data were used to pick specific conditions for column experiments.

Experiment 7.2 – Column runs under WP conditions

[0201] The experiments discussed here were performed under conditions corresponding to a range of partitioning coefficients identified by the HTS experiments. These experiments were specifically performed to highlight the superior performance of the

cHA step under weak partitioning conditions for the removal of HCP and product related HMW species. Four runs were conducted with a product load challenges of 55 mg/ml of resin. The load challenge used in these experiments is low for weak partitioning chromatography, but is typical for flow-through operation. No attempt was made in these experiments to optimize load challenge for weak partitioning chromatography.

[0202] The partially purified antibody pools from the Protein A step were used in these experiments. The column diameter was 0.5 cm and the column height was 10 cm.

[0203] For all hydroxyapatite chromatography steps described in the Experiment 7 series, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150 - 240 cm/hr	
Equilibration 1	300 mM sodium phosphate, 1.0M NaCl, pH 6.8 (2-5 column volumes)
Equilibration 2	1 – 8 mM sodium phosphate, 50 – 1750 mM NaCl, 12 – 50 mM Arg, 20-50mM HEPES pH 7.0 (5 column volumes)
Wash	Same as Equilibration 2

[0204] The column was equilibrated with 2-5 column volumes of equilibration buffer 1 followed by 5 column volumes of equilibration 2. The column was then loaded to 55 mg product/ml resin with the Protein A peak (adjusted to the appropriate equilibration 2 buffer), and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction. The results from these experiments are presented in Table 7.2.1 and Figure 13.

Table 7.2.1: Partition coefficients for MAB-MYO on cHA resin and the corresponding operating mode

	Partition Coefficient K _p	Operating mode	Arg mM	Hepes mM	Phos mM	NaCl mM	Product Bound mg/ml
Run 1	3.6	Weak Partitioning	50	20	8	300	5.1
Run 2	4.2	Weak Partitioning	50	20	2	600	8.2
Run 3	8.9*	Weak Partitioning	12	20	1	1750	9.5
Run 4	>100	Strong Binding	50	50	5	50	41.6

* Optimal K_p condition, see Figure 13

[0205] The operating conditions in these experiments correspond to the flow-through, weak partitioning (WP) and binding regions. The HTS experiment described in Experiment 7.1 provides estimates for the value of the partition coefficient (K_p) under these conditions of pH, chloride, phosphate, glycine / arginine and HEPES concentration. The runs in Table

7.2.1 are ranked by the partition coefficients. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance. This method of determining the bound product typically underestimates the amount of product bound during the load due to the gradual desorption of the product during the wash. The product related High Molecular weight (HMW) removal and product recovery results from these experiments are also presented in Figure 13.

It is evident from the data presented in Figure 13 that the performance of the cHA step improves significantly with respect to HMW reduction as we move from flow-through conditions to weak partitioning conditions, while product recovery is >80%. Operating under conditions corresponding to a further increase in the partition coefficient (i.e., operating in the binding region) provides no additional benefit with respect to contaminant removal.

However, the product recovery across the step begins to drop under strong binding conditions. Thus, the optimum operating window for this separation corresponds to that of weak partitioning chromatography. Under these conditions, a 20-fold reduction of product related HMW species was obtained. The bound product levels under the weak partitioning conditions, in this example, were between 5.1-9.5 mg/ml of the resin.

Summary

[0206] A second example was presented in hydroxyapatite where operating under weak partitioning chromatography was shown to provide improved performance with respect to HMW reduction with good product recovery (> 80%). Product related HMW species and HMW species bind more tightly to ceramic resin than the product antibody, and is retained strongly under WP conditions. The WP region in this example corresponds to partition coefficients between 8 and 20.

[0207] It was once again shown that the performance of the column step can be optimized primarily through the choice of partition coefficients used to run the column. The approach presented here provides a simple means of relating the impact of changing any one of several variables (pH, salt, phosphate, arginine, HEPES etc.,) to column performance. The weak partitioning conditions for optimum performance can easily be identified using the HTS methods described in this example. The approach presented here opens up the possibility of operating in a wider operating space in this mode of chromatography than has been done before.

[0208] It is also worth noting here that the concept of weak partitioning chromatography also works in systems that are not driven by charge interactions alone. The

general approach described in this application can be successfully applied to complex systems such as HIC and hydroxyapatite as well. For example, in addition to the operating pH, several other variables such as NaCl, phosphate salts, arginine / glycine, buffering species, as well as the type of resin can all impact step performance in hydroxyapatite. Nevertheless, one could easily identify the WP window by performing simple batch binding experiments with the product of interest alone.

Series 8 – Zwitterionic buffer for Protein A elution and subsequent ion exchange steps

[0209] A culture containing a monoclonal antibody was purified using MabSelect resin. A Mabselect Protein A column was equilibrated with 5 column volumes of 50 mM Tris/150 mM NaCl, pH 7.5. The column was then loaded at a load of approximately 40 mg product/ml resin. This was followed by a 5CV wash in 1M NaCl, 50mM Tris, pH 7.5 and a 5CV wash containing 10 mM Tris, 75mM NaCl, pH 7.5 wash. The column was then eluted using 30mM HEPES, pH 3.1. The product pool was neutralized to pH 7.2 using 1M HEPES pH 8.0, resulting in a total HEPES concentration of 55mM. At pH 7.2, the HEPES contributes 17mM ionic strength to the buffer.

[0210] All references cited herein are incorporated herein by reference in their entirety and for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety for all purposes. To the extent publications and patents or patent applications incorporated by reference contradict the disclosure contained in the specification, the specification is intended to supercede and/or take precedence over any such contradictory material.

[0211] All numbers expressing quantities of ingredients, reaction conditions, and so forth used in the specification and claims are to be understood as being modified in all instances by the term "about." Accordingly, unless indicated to the contrary, the numerical parameters set forth in the specification and attached claims are approximations that may vary depending upon the desired properties sought to be obtained by the present invention. At the very least, and not as an attempt to limit the application of the doctrine of equivalents to the scope of the claims, each numerical parameter should be construed in light of the number of significant digits and ordinary rounding approaches.

[0212] Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific

embodiments described herein are offered by way of example only and are not meant to be limiting in any way. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with a true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims.

Claims

We claim:

1. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of product per mL of medium; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

2. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

3. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of product per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

- 00051
4. The method of any one of claims 1-3, wherein the operating conditions are identified in a screening step.
 5. The method of any one of claims 1-3, wherein the operating conditions comprise pH levels and ionic strengths.
 6. The method of claim 5, wherein the operating conditions further comprise salt concentrations.
 7. The method of claim 5, wherein the operating conditions further comprise excipient concentrations.
 8. The method of claim 7, wherein the operating conditions further comprise phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations.
 9. The method of any one of claims 1-3, wherein the operating conditions comprise counterligand levels and pH levels.
 10. The method of claim 9, wherein the operating conditions further comprise imidazole concentrations.
 11. The method of claim 4, wherein the screening step uses batch binding studies.

12. The method of claim 4, wherein the screening step uses column binding studies.
13. The method of claim 12, wherein the column binding studies are gradient elution studies.
14. The method of claim 12, wherein the column binding studies are isocratic elution studies.
15. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 5 mg of product per mL of medium.
16. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 10 mg of product per mL of medium.
17. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 20 mg of product per mL of medium.
18. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 30 mg of product per mL of medium.
19. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 40 mg of product per mL of medium.
20. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 50 mg of product per mL of medium.

- 00003
21. The method of claim 1, wherein the operating conditions cause the medium to bind at least 60 mg of product per mL of medium.
 22. The method of claim 2, wherein the value of the partition coefficient is in the range of about 0.2 to about 20.0.
 23. The method of claim 2, wherein the value of the partition coefficient is in the range of about 0.2 to about 10.0.
 24. The method of claim 2, wherein the value of the partition coefficient is in the range of about 1.0 to about 5.0.
 25. The method of claim 2, wherein the value of the partition coefficient is in the range of about 0.5 to about 5.0.
 26. The method of claim 2, wherein the value of the partition coefficient is in the range of about 0.5 to about 1.5.
 27. The method of any one of claims 1-3, wherein the product is a protein selected from the group consisting of fusion proteins, Fc-containing proteins, immunoconjugates, cytokines, interleukins, hormones, and therapeutic enzymes.
 28. The method of claim 23, wherein the Fc-containing protein is an antibody.

29. The method of any one of claims 1-3, wherein the medium is a charged ion exchange medium.
30. The method of claim 29, wherein the charged ion exchange medium is an anion exchange resin.
31. The method of claim 29, wherein the charged ion exchange medium is a cation exchange resin.
32. The method of any one of claims 1-3, wherein the medium is a hydrophobic interaction chromatography resin.
33. The method of any one of claims 1-3, wherein the medium is a hydroxyapatite resin.
34. The method of any one of claims 1-3, wherein the medium is an immobilized metal affinity chromatography resin.
35. The method of any one of claims 1-3, wherein the one or more impurities are selected from the group consisting of host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, and Protein A.
36. The method of claim 35, wherein the impurities further comprise viruses.

37. The method of claim 35, wherein the impurities comprise host cell proteins with a concentration in the purified product of no more than about 100 ng host cell proteins per mg of product.

38. The method of claim 35, wherein the impurities comprise host cell proteins with a concentration in the purified product of no more than about 250 ng host cell proteins per mg of product.

39. The method of claim 35, wherein the impurities comprise host cell proteins with a concentration in the purified product of no more than about 500 ng host cell proteins per mg of product.

40. The method of claim 35, wherein the impurities comprise Protein A with a concentration in the purified product of no more than about 100 ng Protein A per mg of product.

41. The method of claim 35, wherein the impurities comprise Protein A with a concentration in the purified product of no more than about 50 ng Protein A per mg of product.

42. The method of claim 35, wherein the impurities comprise Protein A with a concentration in the purified product of no more than about 10 ng Protein A per mg of product.

43. The method of claim 35, wherein the impurities comprise nucleic acids with a concentration in the purified product of no more than about 1 ng nucleic acids per mg of product.
44. The method of claim 35, wherein the concentration of product variants in the purified product is no more than about 0.5%.
45. The method of claim 35, wherein the concentration of product variants in the purified product is no more than about 2%.
46. The method of claim 35, wherein the concentration of product variants in the purified product is no more than about 5%.
47. The method of claim 35, wherein the concentration of product variants in the purified product is no more than about 10%.
48. The method of claim 36, wherein the log removal value of the viruses is greater than 1.0.
49. The method of claim 36, wherein the log removal value of the viruses is greater than 2.0.
50. The method of claim 36, wherein the log removal value of the viruses is greater than 3.0.

- 00007
51. The method of claim 35, wherein the log removal value of the host cell proteins is at least 1.0.
52. The method of claim 35, wherein the log removal value of the host cell proteins is at least 2.0.
53. The method of claim 35, wherein the log removal value of the host cell proteins is at least 3.0.
54. The method of claim 35, wherein the log removal value of the Protein A is at least 1.0.
55. The method of claim 35, wherein the log removal value of the Protein A is at least 2.0.
56. The method of claim 35, wherein the log removal value of the Protein A is at least 3.0.
57. The method of any one of claims 1-3, wherein a product-containing fluid is eluted from a Protein A column using an elution buffer of low ionic strength; the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 20mM of the ionic strength of the product-containing fluid, resulting in the load fluid; and wherein such load fluid is passed through an ion exchange medium.

58. The method of claim 57, wherein the load fluid is passed through an anion exchange medium without the need for diafiltration.
59. The method of claim 57, wherein the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 40mM of the ionic strength of the product-containing fluid.
60. The method of claim 57, wherein the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 60mM of the ionic strength of the product-containing fluid.
61. The method of claim 57, wherein the pH and conductivity of the product-containing fluid is adjusted using a neutralization buffer which results in no more than 80mM of the ionic strength of the product-containing fluid.
62. The method of claim 57, wherein the elution buffer comprises molecules with a charged anionic group with a pKa of 2-5.
63. The method of claim 62, wherein the elution buffer further comprises molecules with a charged cationic group with a pKa of 6.5-10.
64. The method of claim 57, wherein the elution buffer comprises molecules that are zwitterions at pHs between 4 and 9.

65. The method of claim 64, wherein the zwitterions are selected from the group consisting of glycine; 1,4-piperazinebis-(ethanesulfonic acid); glycylglycine; cyclopentanetetra-1,2,3,4-carboxylic acid; N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid; 2-(N-morpholino)propane-sulfonic acid; N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropane sulfonic acid; N-tris(hydroxymethyl)methylglycine; glycnamide; N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine; N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminopropane sulfonic acid; and N-glycyl-glycine.

66. The method of claim 65, where the zwitterions comprise glycine.

67. The method of claim 57, wherein the ionic strength of the load fluid is no more than 100 mM.

68. The method of claim 57, wherein the ionic strength of the load fluid is no more than 50 mM.

69. The method of claim 57, wherein the ionic strength of the load fluid is no more than 25 mM.

70. The method of claim 57, wherein the ionic strength of the load fluid is no more than 10 mM.

71. The method of any one of claims 1-3, wherein the medium removes at least 90% of the impurities selected from the group consisting of host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, and Protein A.
72. The method of claim 71, wherein the medium removes at least 99% of the impurities selected from the group consisting of host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, and Protein A.
73. The method of claim 72, wherein the medium removes at least 99.9% of the impurities selected from the group consisting of host cell proteins, nucleic acids, product variants, endotoxins, and Protein A.
74. The method of any one of claims 1-3, wherein the total product mass bound to the medium is at least 10% of the total product mass loaded onto the medium.
75. The method of claim 74, wherein the total product mass bound to the medium is at least 20% of the total product mass loaded onto the medium.
76. The method of claim 75, wherein the total product mass bound to the medium is at least 30% of the total product mass loaded onto the medium.
77. The method of any one of claims 1-3, wherein the loading of the product onto the medium is at least 10 mg of product per mL of medium.

78. The method of claim 77, wherein the loading of the product onto the medium is at least 50 mg of product per mL of medium.
79. The method of claim 78, wherein the loading of the product onto the medium is at least 100 mg of product per mL of medium.
80. The method of claim 79, wherein the loading of the product onto the medium is at least 500 mg of product per mL of medium.
81. The method of claim 80, wherein the loading of the product onto the medium is at least 1000 mg of product per mL of medium.
82. The method of any one of claims 1-3, wherein the concentration of product in the load fluid is at least 1 mg of product per mL of load fluid.
83. The method of claim 82, wherein the concentration of product in the load fluid is at least 5 mg of product per mL of load fluid.
84. The method of claim 83, wherein the concentration of product in the load fluid is at least 10 mg of product per mL of load fluid.
85. The method of claim 84, wherein the concentration of product in the load fluid is at least 50 mg of product per mL of load fluid.

86. The method of claim 85, wherein the concentration of product in the load fluid is at least 100 mg of product per mL of load fluid.
87. The purified product prepared by the method of claim 1.
88. The purified product prepared by the method of claim 2.
89. The purified product prepared by the method of claim 3.
90. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:
- passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of protein per mL of medium; and
 - recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.
91. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:
- passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; and
 - recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.
92. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of protein per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; and

recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

93. The purified protein prepared by the method of claim 90.

94. The purified protein prepared by the method of claim 91.

95. The purified protein prepared by the method of claim 92.

96. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of antibody per mL of medium; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

97. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

98. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

99. The purified antibody prepared by the method of claim 96.

100. The purified antibody prepared by the method of claim 97.

101. The purified antibody prepared by the method of claim 98.

102. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of product per mL of medium; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

103. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

104. A method of recovering a purified product from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of product per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified product in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

105. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of protein per mL of medium; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

106. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

107. A method of recovering a purified protein from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of protein per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified protein in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

108. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of antibody per mL of medium; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

109. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

110. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions are identified in a screening step; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

111. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a charged ion exchange medium at operating conditions which cause the medium to bind at least 1mg of antibody per mL of medium; wherein the operating conditions comprise pH levels and ionic strengths; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

112. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a charged ion exchange medium at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions comprise pH levels and ionic strengths; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

113. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a charged ion exchange medium at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions comprise pH levels and ionic strengths; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

114. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydrophobic interaction chromatography resin at operating conditions which cause the resin to bind at least 1mg of antibody per mL of resin; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, and salt concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

115. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydrophobic interaction chromatography resin at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, and salt concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

116. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydrophobic interaction chromatography resin at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, and salt concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

117. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydroxyapatite chromatography resin at operating conditions which cause the resin to bind at least 1mg of antibody per mL of resin; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

118. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydroxyapatite chromatography resin at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

119. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through a hydroxyapatite chromatography resin at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions comprise pH levels, ionic strengths, phosphate concentrations, calcium concentrations, arginine concentrations, glycine concentrations, and HEPES concentrations; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

120. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through an immobilized metal affinity chromatography resin at operating conditions which cause the resin to bind at least 1mg of antibody per mL of resin; wherein the operating conditions comprise counterligand levels and pH levels; and recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

121. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

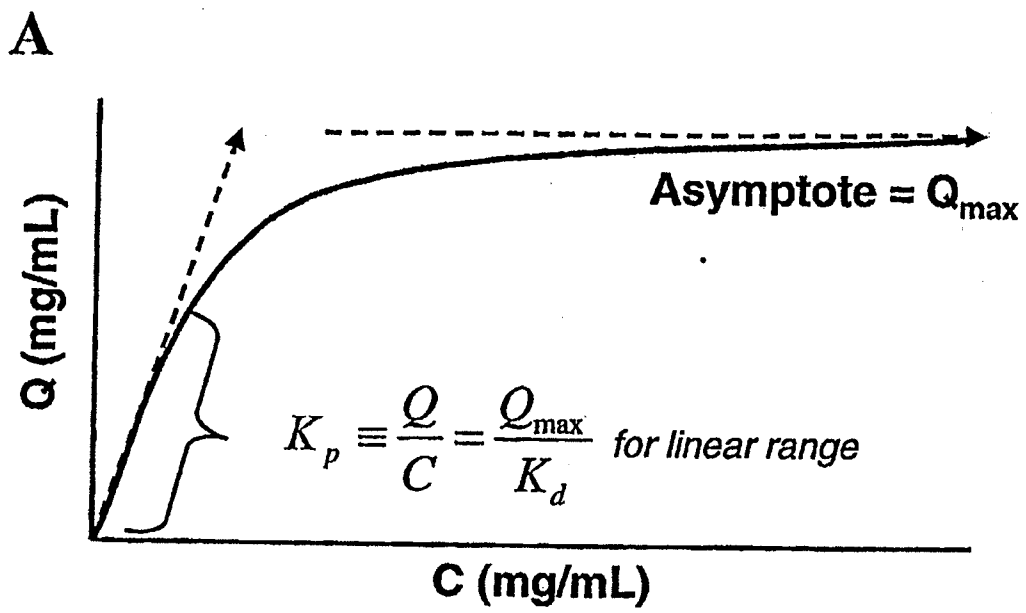
passing the load fluid through an immobilized metal affinity chromatography resin at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; wherein the operating conditions comprise counterligand levels and pH levels; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

122. A method of recovering a purified antibody from a load fluid including one or more impurities, comprising the steps of:

passing the load fluid through an immobilized metal affinity chromatography resin at operating conditions which cause the medium to bind from at least 1 to about 70 mg of antibody per mL of medium and defined by a partition coefficient of 0.3 to 20; wherein the operating conditions comprise counterligand levels and pH levels; and

recovering the purified antibody in the column effluent during the load cycle and any essentially isocratic wash.

FIGURE 1

1B

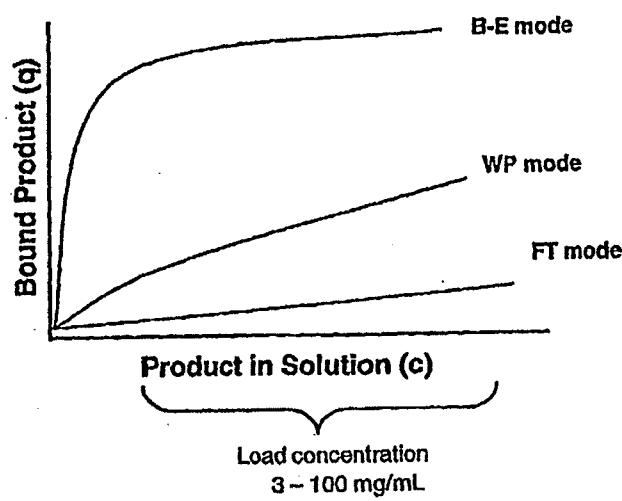
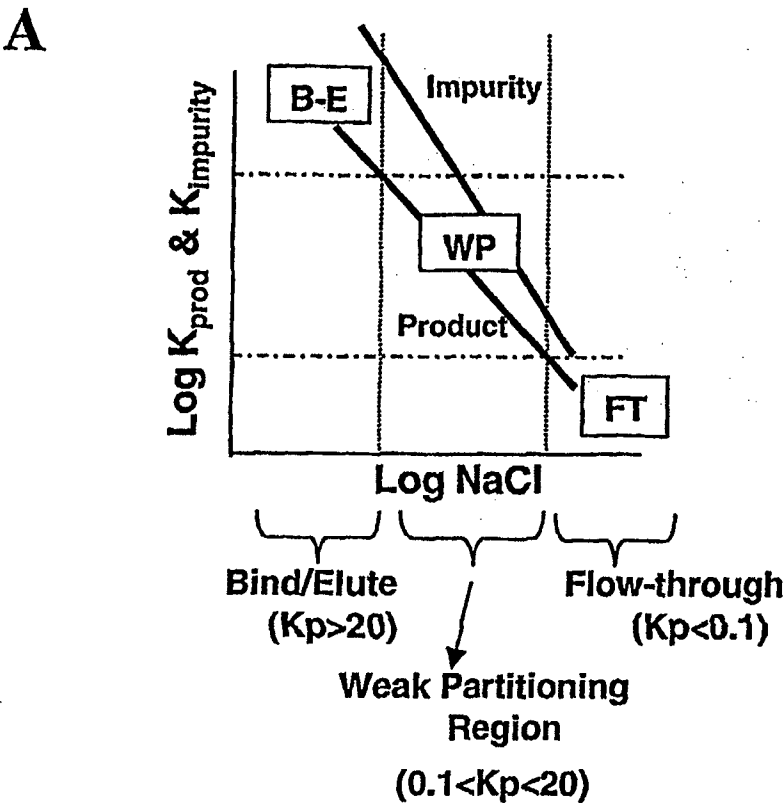


FIGURE 2



2B

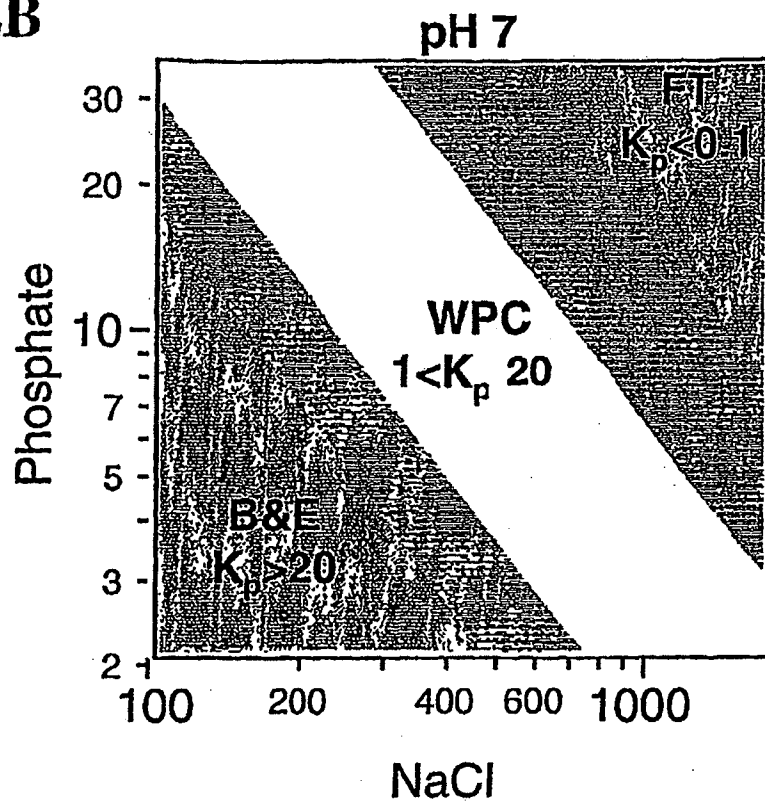
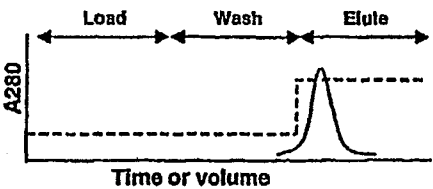


FIGURE 3

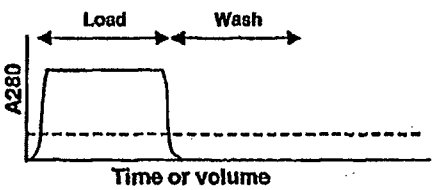
• Bind-Elute (B-E)

- ▶ High $K_{Prod} > 20$
- ▶ Capacity limit: product mass on resin (not load volume)
- ▶ Change in mobile phase to elute product



• Flowthrough (FT)

- ▶ Very low $K_{Prod} < 0.1$
- ▶ Capacity limit: impurity breakthrough and volume
- ▶ Isocratic
- ▶ Chromatogram with rapid breakthrough, washout



• Weak Partitioning (WP)

- ▶ Intermediate $K_{Prod} 0.1 < K < 20$
- ▶ Capacity improved over FT mode (both load volume & mass)
- ▶ Isocratic
- ▶ Delayed breakthrough, lagging washout

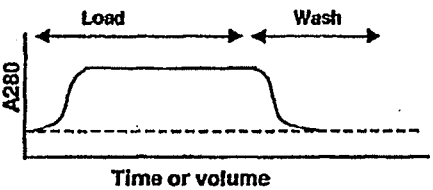


FIGURE 4

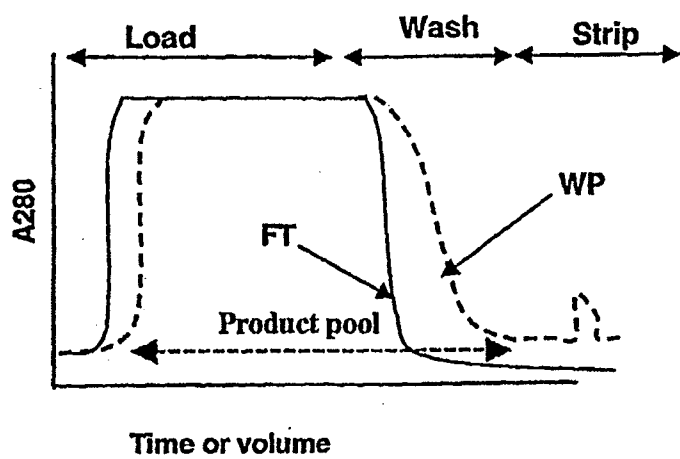


Figure 5

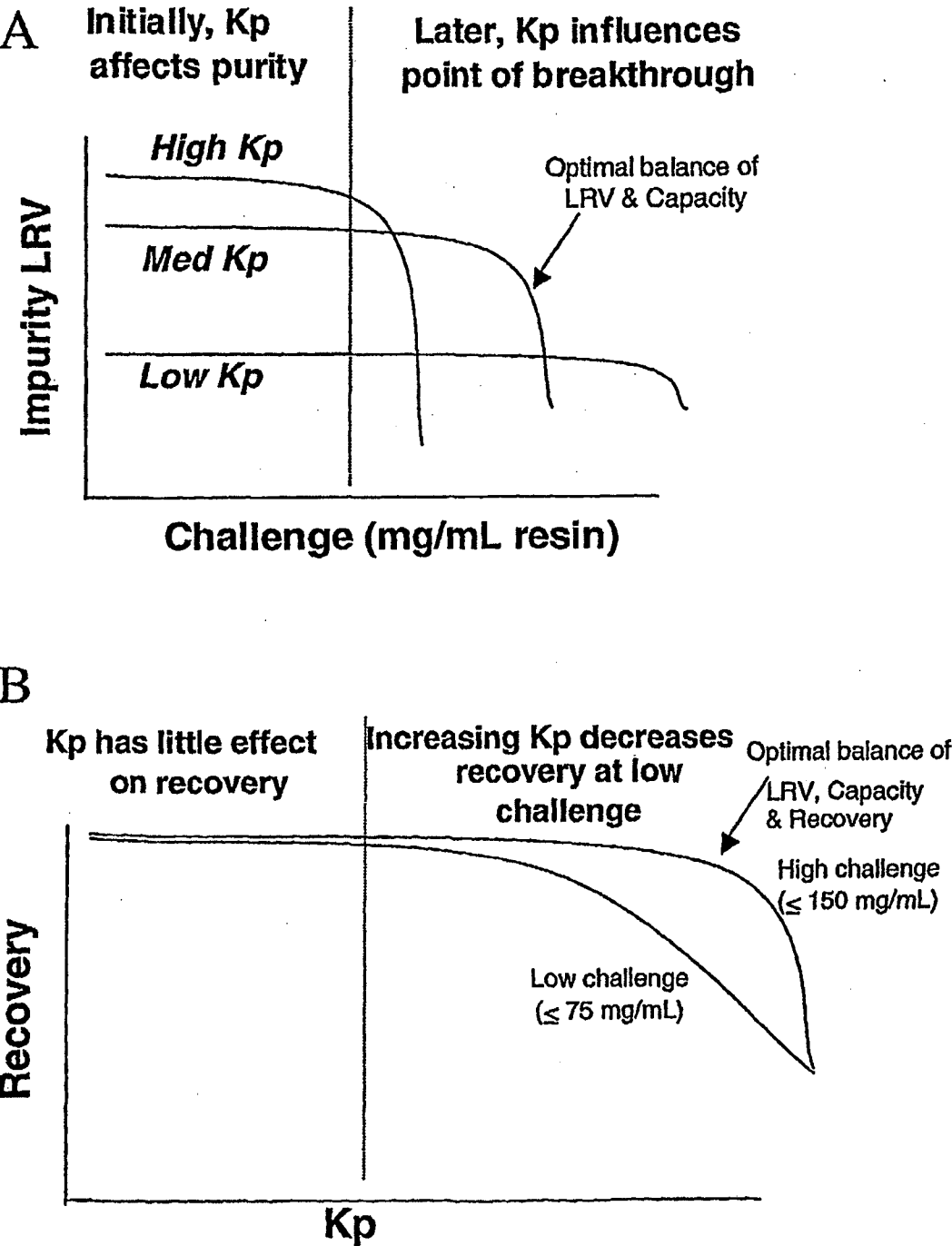


FIGURE 6

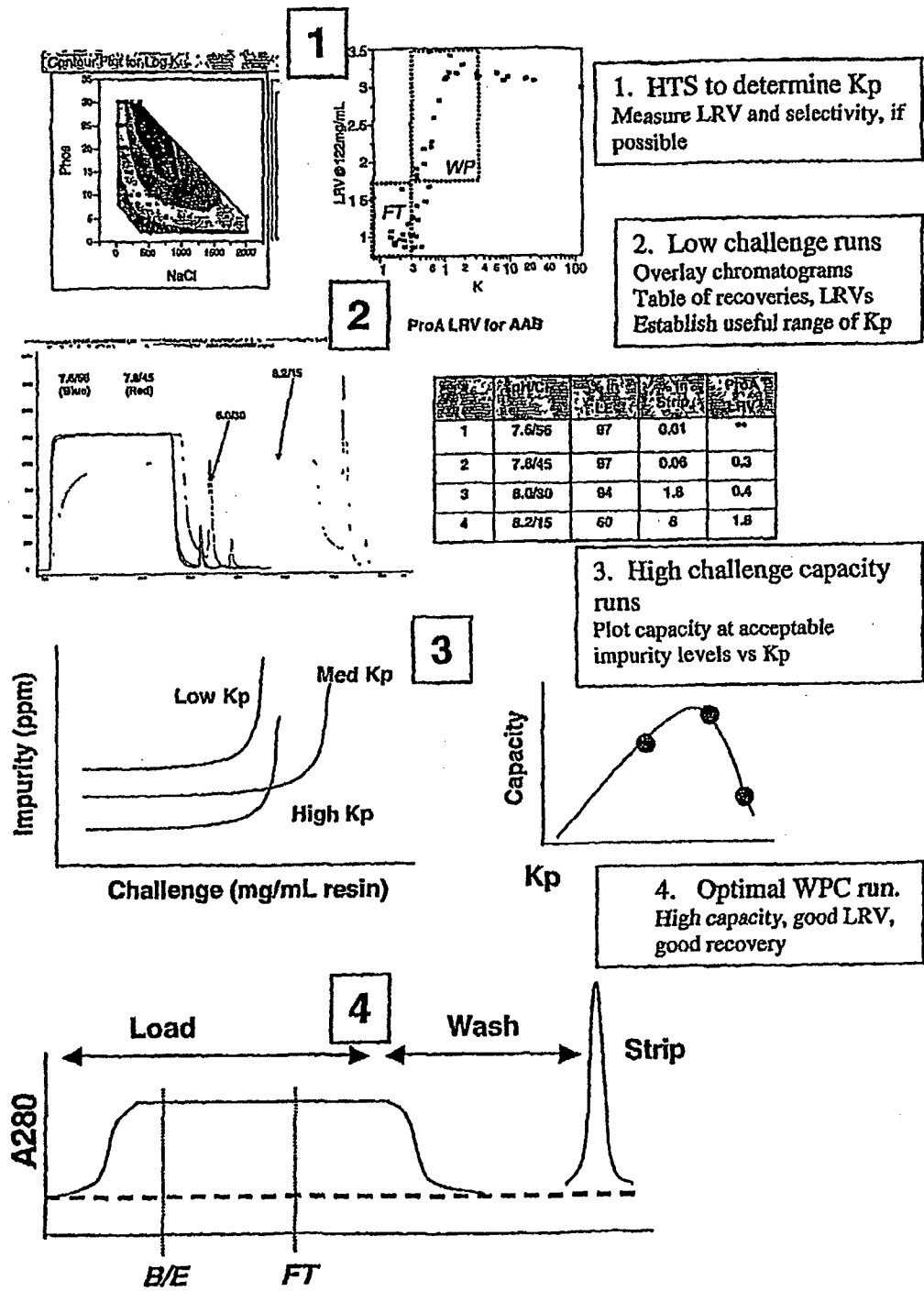


FIGURE 7

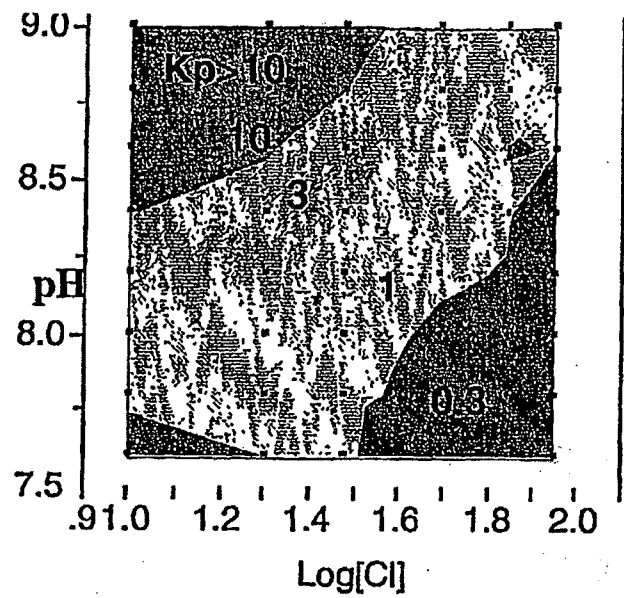


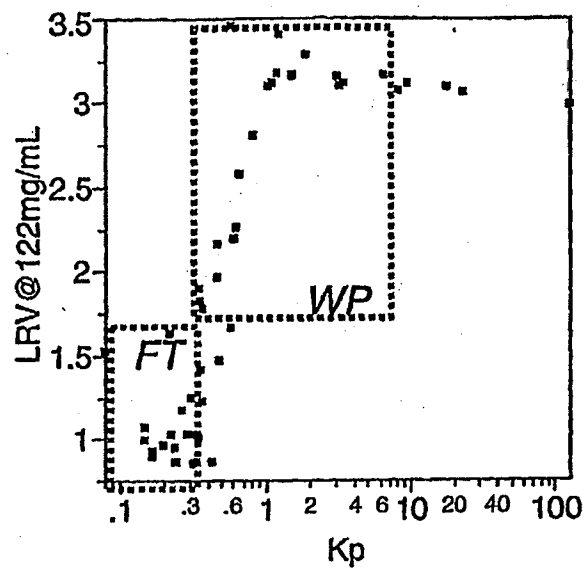
FIGURE 8

FIGURE 9

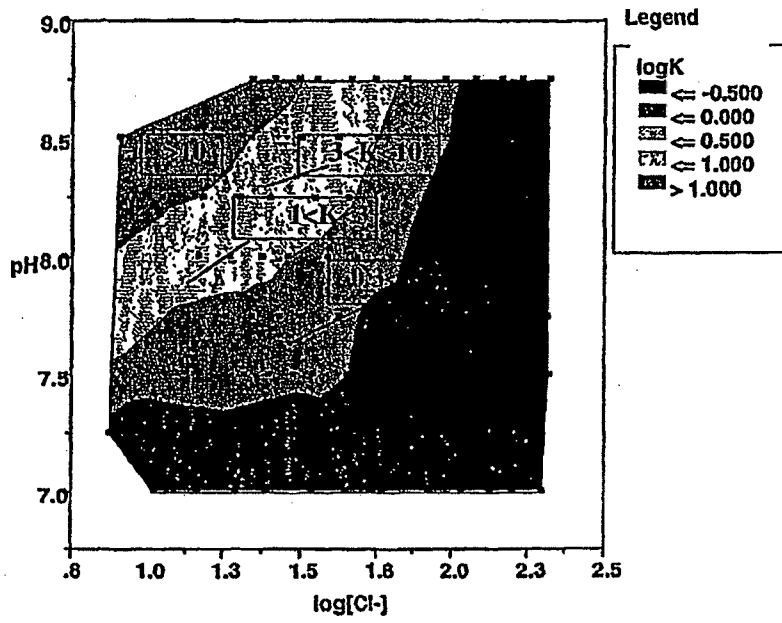


Figure 10

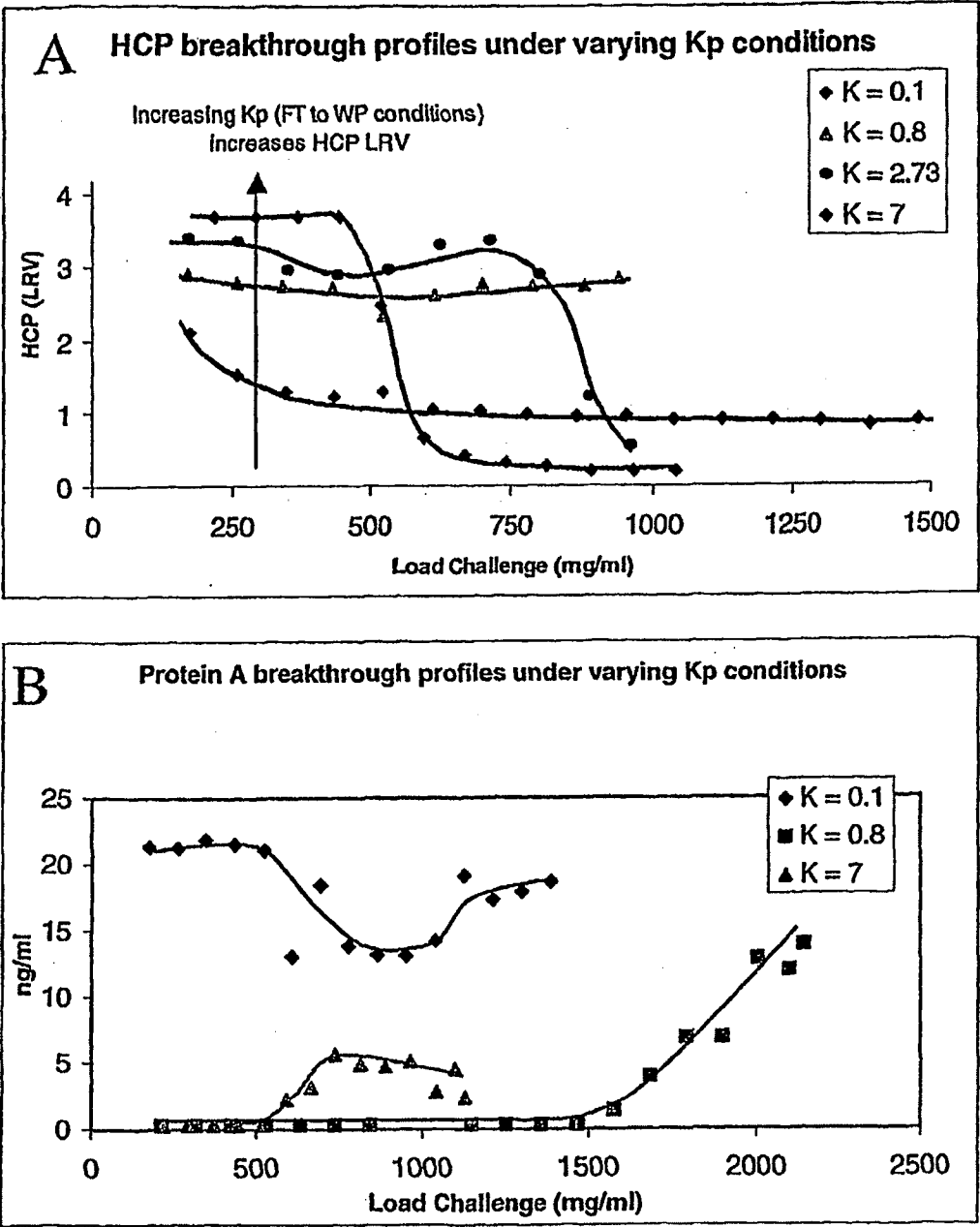


Figure 11

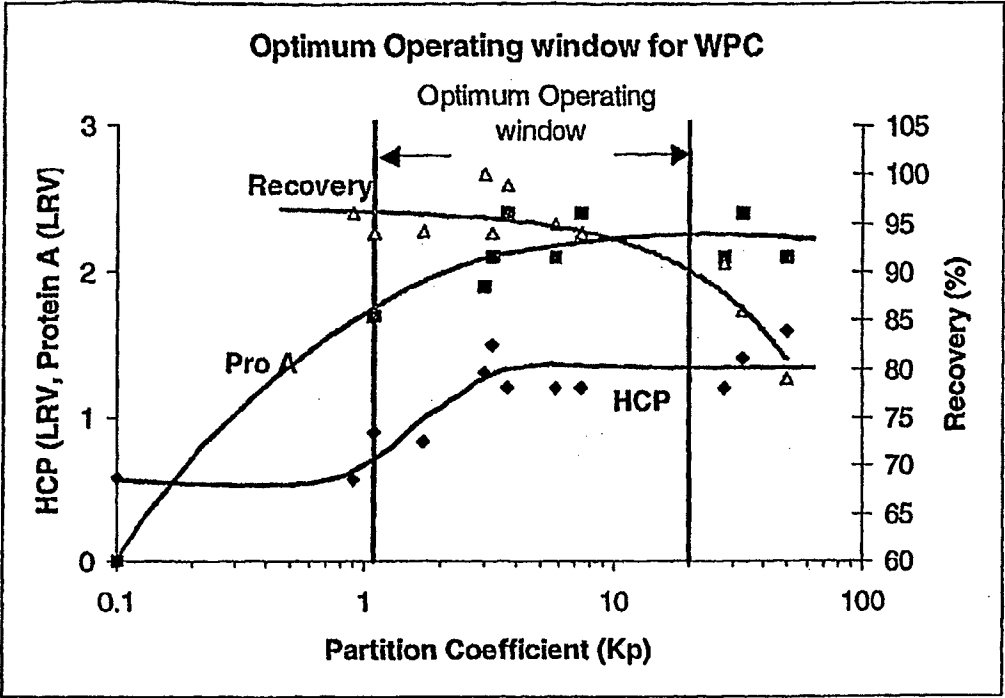


FIGURE 12

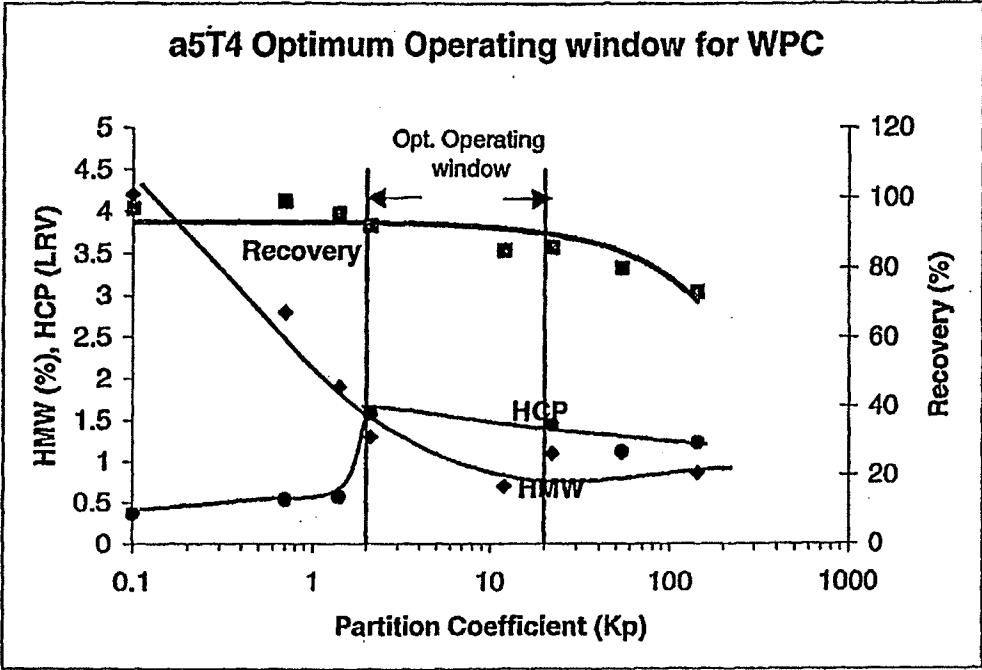
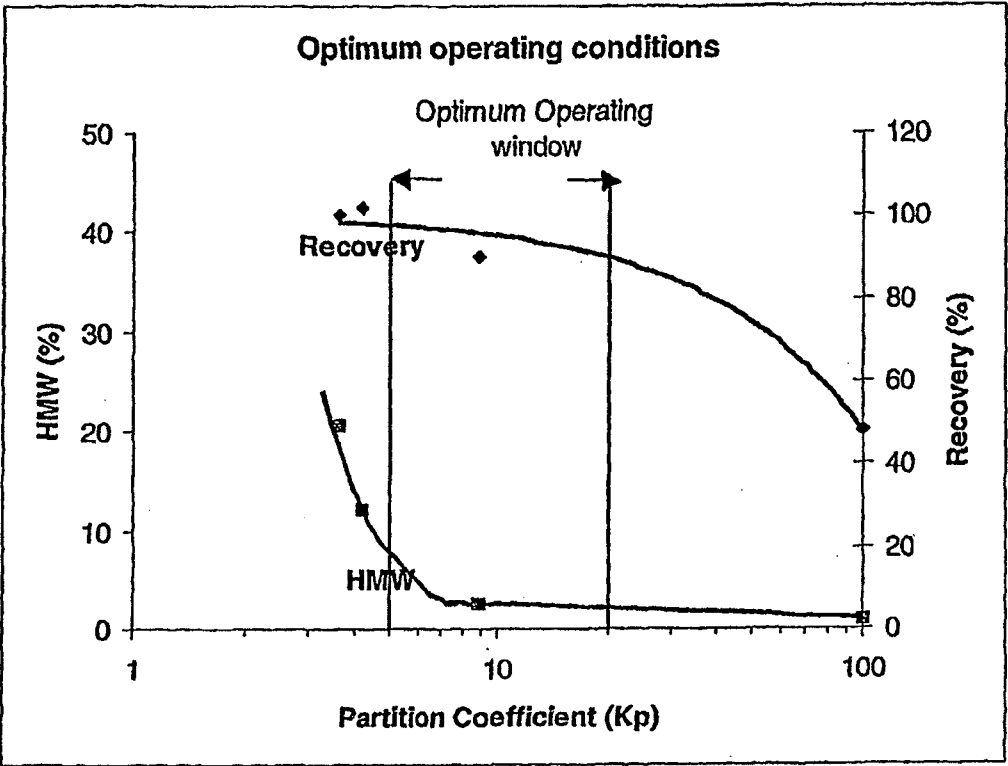


Figure 13



00007

UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN DÉBILCampo de la Invención

5 **[0001]** La invención se relaciona con métodos para recuperar un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas. En ciertas modalidades de la invención los métodos comprenden pasar el fluido de carga por un medio en condiciones de operación que originan que el

10 medio se una por lo menos un 1 mg de producto por ml de medio, y recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y esencialmente cualquier lavado isocrático. En otras modalidades de la invención, los métodos comprenden pasar la carga a través de un medio en

15 condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

Antecedentes de la Invención

20 **[0002]** Dentro de la industria de la biotecnología, la purificación de proteínas a escala comercial es un reto importante para el desarrollo de proteínas recombinantes para propósitos terapéutico y de diagnóstico. Los problemas relacionados con el rendimiento, pureza, y resultados plagan

25 al sector manufacturero. Con el advenimiento de la tecnología de proteína recombinante, una proteína de interés puede ser producida usando líneas celulares anfitrionas eucarióticas o procarióticas cultivadas manipuladas por ingeniería para

ABSTRACT

expresar un gen que codifique la proteína. Lo que resulta del proceso de cultivo de células anfitrionas, sin embargo, es una mezcla de la proteína deseada junto con impurezas que son derivadas de la proteína misma, tales como variantes de la proteína, o de la célula anfitriona, tales como proteína de la célula anfitriona. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas es contingente por ser capaz de recuperar de manera confiable en niveles adecuados de la proteína a partir de estas impurezas.

[0003] Los métodos de purificación de proteínas convencionales están diseñados para separar la proteína de interés de las impurezas con base en diferencias en tamaño, carga, solubilidad, y grado de hidrofobicidad. Tales métodos incluyen métodos cromatográficos tales como cromatografía por afinidad, cromatografía por intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, y cromatografía de hidroxapatita. Estos métodos emplean frecuentemente un medio de separación que puede estar diseñado para adherirse selectivamente a la proteína de interés o a las impurezas. En el modo de ligado por el ruido, la proteína deseada se liga selectivamente al medio de separación y es eluida diferencialmente desde el medio mediante diferentes disolventes. En el modo de flujo continuo, las impurezas específicamente se ligan al medio de separación mientras que la proteína de interés no lo hace,

00000

permitiendo así la recuperación de la proteína deseada en el "flujo continuo".

[0004] Métodos usuales para la purificación de proteínas tales como anticuerpos, incluye dos o más etapas cromatográficas. Por ejemplo, la primer etapa para el protocolo de purificación de proteínas frecuentemente involucra una etapa de cromatografía por afinidad que utiliza una interacción específica entre la proteína de interés y un reactivo de captura inmovilizado. Los absorbentes de la proteínas A son particularmente útiles para la captura por afinidad de las proteínas, tales como los anticuerpos, que contienen una región Fc. Sin embargo, los inconvenientes en usar la cromatografía de proteína A para la purificación de proteínas incluye la fuga del agente de captura de proteína A, llevando a la contaminación del producto de proteína eluido. Adicionalmente la captura por afinidad no separa las variantes de la proteína, tales como formas agregadas de la proteína, de la proteína de interés.

20

[0005] Los investigadores han usado los métodos de ligado-eluido, o los métodos de flujo continuo, y métodos de desplazamiento en esfuerzos para recuperar las proteínas libres de las impurezas resultantes tanto del proceso de cultivo como de las etapas anteriores posibles en el proceso de purificación mismo. Ejemplos de grupos que usan la etapa de ligado-eluido como una segunda etapa típica para purificar proteínas luego de una etapa de captura por afinidad incluye:

25

00190

la Patente estadounidense 4,983,722, que describe un método de intercambio iónico mediante ligado-eluido de reducir la proteína A desde una mezcla; la Patente estadounidense 5,429,746, que describe un método de cromatografía de interacción hidrófoba ligado-eluido para purificar el anticuerpo IgG de una mezcla que incluye impurezas de proteína A; y la Patente estadounidense 5,644,036, que describe un proceso de tres etapas para obtener una preparación de anticuerpo IgG purificada que comprende una etapa de proteína A, una etapa de intercambio iónico por ligado-eluido, y una etapa de exclusión de tamaño. Otros grupos han usado una etapa de flujo continuo después de la etapa de cromatografía por afinidad. Por ejemplo, la publicación PCT WO 04/076485 describe un método para remover una proteína A fugada de un anticuerpo purificado por una etapa de cromatografía por proteína A luego de una etapa de intercambio iónico por flujo continuo. La publicación PCT WO 03/059935 describe un método para purificar una proteína en una muestra que comprende someter la muestra a una etapa de cromatografía por hidroxapatita de flujo continuo luego de una etapa de cromatografía por afinidad.

[0006] Otros grupos han usado un esquema único de etapa de purificación por brillado para evitar los problemas asociados con las etapas de purificación anteriores. Por ejemplo, la Patente estadounidense 6,177,548 describe un método de flujo de etapa única- intercambio iónico pasante para remover los agregados de una muestra biológica en donde el pH de la

00101

muestra es ajustado a 0,2 logaritmos por debajo del punto isoelectrico de la muestra biológica. La Patente estadounidense 5,451,662 describe un método de etapa única de intercambio de ión por ligado-eluido en donde el pH de la
5 mezcla de proteína cruda es ajustado a un punto entre los rasgos de puntos isoelectricos de las fracciones de proteína que van a ser separadas. La publicación PCT WO 05/044856 describe un método de etapa única por desplazamiento para la remoción de agregados de alto peso molecular de preparaciones
10 de anticuerpos usando cromatografía de hidroxapatita.

[0007] Ninguno de los métodos de ligado-eluido o flujo continuo en el estado de la técnica, sin embargo, son capaces de cumplir con las necesidades de la industria biotecnológica
15 en términos de todos los requerimientos de rendimiento, producción, y pureza del producto. Los métodos de ligado-eluido y los métodos por desplazamiento están limitados por, entre otros factores, el límite de capacidad del medio de separación para la proteína deseada. Los métodos de flujo
20 continuo, por otro lado, permiten exposiciones de carga mayores que los métodos de ligado-eluido pero están limitados por la capacidad del medio de separación en cuanto a las impurezas. Con los métodos de flujo continuo, ningún ligado sustancial del producto a la columna ocurre; cualquier ligado
25 sustancial de producto es visto como recuperación que impactan negativamente al producto. Existe una necesidad de tener métodos de recuperación de proteínas purificadas con una de alto rendimiento que cumplan con los requerimientos de

00192

pureza y desempeño necesarios para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Adicionalmente, los procesos comerciales de fabricación agregan la necesidad de esquemas de purificación confiables, robustos, efectivos en cuanto a costo.

5

Resumen de la Invención

[0008] La presente invención se relaciona con métodos para recuperar un producto purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio y recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático. En otras modalidades las condiciones operativas causan que el medio ligue por lo menos 5 mg de producto por mL de medio. En otra modalidad las condiciones operativas causan que el medio ligue por lo menos 10 mg del producto por mL de medio. En otras modalidades las condiciones operativas causan que el medio ligue por lo menos 20, 30, 40, 50 o 60 mg de producto por mL de medio.

[0009] La presente invención también se relaciona con métodos para recuperar un producto purificado desde un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido de carga por un medio en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1 y recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el

00103

ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático. En una modalidad, el coeficiente de partición está en el rango de cerca de 0,2 a cerca de 20,0. En otra modalidad, el coeficiente de partición está en el rango de cerca de 0,2 a
5 cerca de 10,0. En otra modalidad, el coeficiente de partición está en el rango entre cerca de 1,0 a cerca de 5,0. En otra modalidad, el coeficiente de partición está en el rango entre cerca de 0,5 a cerca de 5,0. En una modalidad adicional, el coeficiente de partición está en el rango entre 0,5 a cerca
10 de 1,5.

[0010] La presente invención también se relaciona con métodos para recuperar un producto purificado desde un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido
15 de carga por un medio en condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos 1 a cerca de 70 mg de producto por mL de medio y que está definido por un coeficiente de partición de 0,3 a 20, y recuperar el producto purificado en el efluente de columna durante el ciclo de
20 carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

[0011] La invención también suministra identificar, en una etapa de selección, las condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos un mg de producto por mL de medio
25 o alternatively, están definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1. La etapa de selección puede emplear estudios de ligado por tandas o estudios de ligado en

00101

columna, tal como estudios por gradiente de elución o estudios por elución isocrática.

[0012] Las condiciones operativa e incluyen niveles de pH, 5 fuerzas iónicas, concentraciones de sal, concentraciones de excipientes (tales como concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina, y concentraciones de HEPES), y niveles de contraligando (tales como concentraciones de 10 imidazol), dependiendo de la selección del medio.

[0013] El medio puede ser cualquier tipo de resina cromatográfica o medio de separación, incluyendo un medio d intercambio iónico cargado, tal como un medio de intercambio 15 aniónico, o un medio de intercambio catiónico, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, una resina de hidroxiapatita, o una resina de cromatografía por afinidad de metal inmovilizado.

20 [0014] Los producto purificados pueden ser recuperados usando la invención e incluyen proteínas de fusión, proteínas que contiene Fc, y monoconjugados, citosinas, interleucinas, hormonas, y enzimas terapéuticas.

25 [0015] Las impurezas que pueden ser removidas usando la invención incluyen proteínas de células anfitrionas, ácidos nucleicos, variantes de producto, endotoxinas, proteína A, y virus.

00105

[0016] En una modalidad, el medio remueve por lo menos 99.9% de las impurezas en el fluido de carga incluyendo proteínas de células anfitrionas, ácidos nucleicos, variantes de productos, endotoxinas, y proteína A.

[0017] En otra modalidad, la concentración de las variantes de producto en el producto purificado no es más de cerca del 2%.

10

[0018] En modalidades adicionales, la carga en el medio puede estar en una exposición de carga de por lo menos 500 mg o por lo menos 1000 mg de producto por mL de medio.

15 [0019] En un aspecto de la invención, un producto purificado es recuperado de un fluido de carga incluyendo una o más impurezas al pasar el fluido de carga a través de un medio de intercambio de ión cargado en condiciones operativas que comprenden niveles de pH y fuerzas iónicas que causan que
20 el medio legue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio o alternativamente, en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

[0020] En otro aspecto de la invención, un producto
25 purificado es recuperado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido de carga por una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones operativas que comprenden niveles de pH, fuerzas

00100

iónicas, y concentraciones de sal que causan que el medio ligue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio o alternativamente, en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

5

[0021] En otro aspecto de la invención un producto purificado es recuperado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido de carga por una resina de cromatografía de hidroxapatita en condiciones operativas que comprenden niveles de pH, fuerzas iónicas, concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de argenina, concentraciones de glicina, concentraciones de HEPES, y concentraciones de imidazol que causan que el medio ligue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio o alternativamente, en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

[0022] Todavía en otro aspecto de la invención un producto purificado es recuperado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas al pasar el fluido de carga por una resina de cromatografía por afinidad de metal inmovilizado en condiciones operativas que comprenden niveles de contraligandos y niveles de pH que causa que el medio ligue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio, o alternativamente, en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

00107

[0023] Los métodos de la invención pueden ser combinados opcionalmente con una o más de purificación. La etapa opcional puede llevarse acabo antes de o luego de practicar el método de la invención. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden ser combinados opcionalmente con una etapa de cromatografía por proteína A como una etapa inicial.

[0024] En una modalidad de la invención, un fluido que contiene el producto es eluido de una columna de proteína A usando un amortiguador de elución de baja fuerza iónica; el pH y la conductividad del fluido que contiene el producto se ajusta usando un amortiguador de neutralización que resulta en no más de 20 mM de fuerza iónica del fluido que contiene el producto, resultando en el fluido de carga; y el fluido de carga es pasado por un medio de intercambio aniónico bajo condiciones operativas de la invención.

[0025] En algunas modalidades, el amortiguador de elución comprende moléculas con un grupo catiónico cargado con un pK a de 6.5-10. En otras modalidades, el amortiguador de elución comprende adicionalmente moléculas con un grupo aniónico cargado con un pK a de 2-5. En ciertas modalidades, el amortiguador de elución comprende moléculas que son zwitteriones con pHs entre 7 y 9.

[0026] La invención también suministra productos purificados, incluyen proteínas purificadas de anticuerpos, preparados por los métodos de la invención.

[0027] Objetivos y ventajas adicionales de la invención se establecerán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias de la descripción o pueden ser aprendidas por la
5 práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención serán realizados y logrados por medio de elementos y combinaciones particularmente destacados en las reivindicaciones adjuntas.

10 **[0028]** Debe entenderse que tanto la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son ilustrativas y explicatorias solamente y no son restrictivas de la invención, según se reivindico.

15 **[0029]** Los dibujos adjuntos que son incorporados aquí y constituyen parte de esta especificación, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

20 Breve descripción de las figuras

[0030] La figura 1 muestra (A) la relación entre un coeficiente de partición y un isoterma de absorción del producto; y (B) los isotermos de absorción para productos que
25 ligan a la resina para tres modos de operación: modo ligado-eluido, modo de partición débil, y modo de flujo continuo.

00113

[0031] La figura 2 muestra (A) las regiones de partición para los tres modos de operación en la cromatografía de intercambio de iones: modo de ligado-eluido, modo de partición débil, y modo de flujo continuo; y (B) las regiones de partición para los tres modos de operación en hidroxapatita.

[0032] La figura 3 muestra cromatogramas esquemáticos para los tres modos de operación: modo de ligado-eluido, modo de partición débil, y modo de flujo continuo.

[0033] La figura 4 muestra un comparación entre los cromatogramas de partición débil y de flujo continuo.

[0034] La figura 5 muestra (A) perfiles de remoción de contaminante típicos como una función de K_p y (B) la recuperación como una función del reto de la carga y K_p .

[0035] La figura 6 muestra una progresión típica de la etapa de cromatografía del desarrollo de la etapa de cromatografía de partición débil, incluyendo 1) selección de alto rendimiento para determinar K_p , 2) serie de exposición de carga baja, 3) series de capacidad de alto reto, y 4) series de cromatografía de partición débil optimas.

25

[0036] La figura 7 muestra un grafico de contorno de K_p versus pH y la concentración de cloro total del conjunto de

PCT/US

datos de baja concentración, como se describió en el experimento 1.1.

[0037] La figura 8 muestra la remoción de la proteína A como una función del coeficiente de partición, K_p , como se describió en el experimento 1.1. El valor de remoción en logaritmo se incrementa con el K_p . El modo de flujo continuo es indicado por la caja punteada con "FT", mientras que el modo de partición débil es indicado por la caja punteada con "WP".

[0038] La figura 9 muestra un grafico de contorno de $\log_{10}K_p$ contra pH y el log de la concentración total de cloro, como se describió en el experimento 2.1.

15

[0039] La figura 10 muestra(A) para el Mab-AAB, los perfiles de presentación de proteína en células anfitrionas como una función de K_p en la cromatografía de intercambio de ión; y (B) para Mab-AAB, la presentación de la proteína A como una función de K_p en la cromatografía de intercambio de ión.

[0040] La figura 11 muestra para el Mab-MYA, la ventana operativa optima para la cromatografía de partición débil en hidroxipatita. El K_p óptimo en este ejemplo, esta entre 1,5 y 20.

25

00111

[0041] La figura 12 muestra para Mab-A5T4, la ventana operativa optima para la cromatografía de partición débil en hidroxiapatita. El Kp óptimo en este ejemplo esta entre 2 y 20.

5

[0042] La figura 13 muestra para Mab-MYO, la ventana operativa optima para la cromatografía de partición débil en hidroxiapatita. El Kp óptimo en este ejemplo esta entre 5 y 20.

10

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

15 [0043] Con el objeto de que la presente invención sea más fácilmente entendida ciertos términos son definidos primero. Las definiciones adicionales son establecidas a través de la descripción detallada.

20 [0044] El término "modo de flujo continuo" se refiere a una técnica de separación por preparación de producto en la cual por lo menos un producto contenido en la preparación tiene el propósito de fluir por una resina cromatográfica o medio, mientras que por lo menos un contaminante o impureza
25 potencial se liga a la resina o medio cromatográfico. Generalmente, el coeficiente de partición del producto para el modo de flujo continuo es menor a 0,1 y la concentración

00112

de producto ligado es menor a 1 mg/mL. El "modo de flujo continuo" es una operación isocrática.

[0045] El término "modo ligado-eluido" se refiere a una técnica de separación para preparación de producto en el cual por lo menos un producto contenido en la preparación se liga a una resina cromatográfica o medio. Generalmente, el coeficiente de partición del producto para el modo ligado-eluido es mayor a 20 y las concentraciones de producto ligado están entre 1 a 20 mg/mL. El producto ligado en este modo es eluido durante la fase de elusión.

[0046] El término "modo de partición débil" se refiere a una técnica de separación para preparación de producto en la cual por lo menos un producto contenido en la preparación, y por lo menos un contaminante o impureza, ambos se ligan a una resina o medio cromatográfico. El ligado del producto en el modo de partición débil es de por lo menos de 1 mg por mL de resina o medio cromatográfico. Generalmente, el coeficiente de partición del producto para el modo de partición débil es de por lo menos 0,1. El "modo de partición débil" es una operación isocrática.

[0047] El término " coeficiente de partición " (K_p) se refiere a la proporción de equilibrio de la concentración del producto absorbido en la resina (Q) a la concentración de producto en la solución (c) bajo condiciones especificadas de pH y composición de la solución. El coeficiente de partición

00115

Kp también esta relacionado a los isotérmicos de absorción del producto como se muestra en la figura 1. El coeficiente de partición Kp corresponde a la pendiente de la isotérmica de absorción del producto en concentraciones de solución muy
5 baja. Esta relacionado con la capacidad máxima como sigue:

$$K_p = \frac{Q}{C} = \frac{Q_{\max}}{k_d}$$

C k_d

en donde Q_{max} es la capacidad máxima de la resina para el
10 producto, y K_d es la constante de disociación para la interacción "resina-productos". El coeficiente de partición es medido típicamente con una técnica de ligado por tandas, pero otras técnicas, tales como la cromatografía isocrática, también pueden ser usadas.

15

[0048] El término "producto ligado" (Q) se refiere a la cantidad de producto que se liga a la resina cuando esta en equilibrio con una corriente de alimentación.

20 **[0049]** El término "anticuerpos" se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de ella, y e involucra cualquier polipéptido que comprende un sitio de ligado antígeno. El termino influye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos,
25 no específicos, humanizados, humanos, de cadena única, quiméricos, sintéticos, recombinantes, y híbridos, mutados, injertados, y generados in vitro. El término "anticuerpos"

PC112

también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpo que retiene la función de ligado al antígeno. Típicamente, tales fragmentos comprenderían un dominio de ligado a antígeno.

[0050] En ciertas modalidades de la invención, el anticuerpo es uno que comprende una región C_H2/C_H3 y por lo tanto es conducible a purificación mediante cromatografía por proteína A. El término "región C_H2/C_H3" se refiere a aquellos residuos de amino ácido en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interactúa con la proteína A. En algunas modalidades, la región C_H2/C_H3 comprende una región C_H2 intacta seguida por una región C_H3, y en otras modalidades, comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Ejemplo de proteínas que contienen la región C_H2/C_H incluyen anticuerpos inmunoadhesiones y proteínas de fisión que comprenden un proteína de interés fundida a, o conjugada con, una región C_H2/C_H3.

20

[0051] El término "carga" se refiere a cualquier material de carga que contiene el producto, sea derivado de cultivo de células clarificados o de fermentación del medio condicionado, o un intermedio parcialmente purificado derivado de una etapa de cromatografía. El término "fluido de carga" se refiere a un líquido que contiene el material de carga, para pasar a través de un medio bajo las condiciones operativas de la invención.

25

0015

[0052] El término "impurezas" se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, incluyendo una macro molécula biológica tal como un ADN, ARN, o una proteína, diferente de la proteína de interés que esta siendo purificada que también esta presente en una muestra de la proteína de interés que esta siendo purificada. Las impurezas incluyen, por ejemplo, variantes de proteínas tal como proteínas agregadas, especies de alto peso molecular, especies de bajo molecular y fragmentos y especies desamidatada; otras proteínas de células anfitrionas que secretan la proteína que va hacer purifica (proteínas de la célula anfitriona); proteínas que son parte de un adsorbente usado para la cromatografía por afinidad que puede lixiviar en una muestra durante las etapas de purificación anteriores, tal como la proteína A; endotoxinas; y virus.

[0053] El término "lavado esencialmente isocrático" se refiere a una solución que varia solamente ligeramente desde el fluido de carga en términos de composición o pH.

[0054] El término "efluente de columna" se refiere al liquido que sale del medio o de la columna durante el ciclo de carga, o en el periodo en que la carga esta siendo aplicada.

[0055] El término "reto de la carga" se refiere a la masa total de producto cargada dentro de la columna en el ciclo de

carga de una etapa de cromatografía o aplicada a la resina en ligado por tandas, medido en unidades de masa de producto por unidad de volumen de resina.

5 **[0056]** El término "valor de logaritmo de remoción" (LRV) se refiere al logaritmo (en base 10) de la proporción de la masa de la impureza en la carga de una etapa de purificación con respecto a la masa de impureza en el grupo del producto.

10 **[0057]** El término "cromatografía isocrática" se refiere a la operación de una columna cromatográfica con un disolvente que no cambia la fuerza durante el periodo de interés.

B. Descripción del Método

15

[0058] La presente invención suministra métodos para recuperar productor purificados de un fluido de carga que contiene una o más impurezas. La invención tiene aplicación en la preparación a gran escala de proteínas para propósitos
20 terapéuticos y de diagnostico.

1. Modo de partición débil

[0059] Los solicitantes han encontrado de manera
25 sorprendente que mediante operar en un modo cromatográfico que reside en la región entre los modos de cromatografía de ligado-eluido y flujo continuo convencionales, un alto grado de reducción de impurezas, lo mismo que una exposición de

00117

carga de producto alta y una recuperación de producto puede ser obtenidos. Los solicitantes han llamado este modo de ligado de producto intermedio, el "modo de partición débil".

5 **[0060]** En el modo de partición débil un fluido de carga que contiene un producto de interés y una o más impurezas es pasado por un medio cromatográfico, con tanto el producto como las impurezas ligadas al medio. Sin embargo, ligar las impurezas de manera más fuerte al medio que el producto y a
10 medida que la carga continua, un producto no ligado pasa por el medio y es recuperado del efluente de la columna. El medio es lavado subsiguientemente de manera opcional bajo condiciones isocráticas para recuperar producto ligado débilmente adicional del medio y el producto de cualquier
15 lavado esencialmente isocráticamente es agrupado con el producto purificado del efluente de columna durante el sitio de carga.

[0061] De acuerdo con la invención, el modo de partición
20 débil está definido por condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos 1 mg de producto por mL de medio. En una modalidad, las condiciones operativas causan que el medio ligue por lo menos 5 mg de producto por mL de medio. En otra modalidad, las condiciones operativas causan que el
25 medio ligue por lo menos 10 mg del producto por mL del medio. En otra modalidad, las condiciones operativas causan que el medio ligue por lo menos 20 mg de producto por mL de medio.

00118

[0062] En ciertas modalidades de la invención, la masa de producto total ligada al medio es de por lo menos 10% de la masa de producto total cargada en el medio. En algunas modalidades, la masa de producto total ligada al medio es por lo menos 20% de la masa de producto total cargado en el medio. En otras modalidades, la masa de producto total ligada al medio es de por lo menos 30% de la masa de producto total cargada en el medio.

10 **[0063]** De acuerdo con la invención, el modo de partición débil también está definido por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1. En algunas modalidades, el modo de partición débil en operación comprende operar bajo condiciones definidas por un coeficiente de partición en el

15 rango entre cerca de 0.2 a cerca de 20.0. En ciertas modalidades, el modo de partición débil, en operación comprende operar bajo condiciones definidas por un coeficiente de partición en el rango entre cerca de 0.2 a cerca de 10.0. En otras modalidades, el modo de partición

20 débil en operación comprende operar bajo condiciones definidas por un coeficiente de partición en el rango entre 1,0 a cerca de 5,0. En otras modalidades, el modo de partición débil en operación comprende operar bajo condiciones definidas por un coeficiente de partición en el

25 rango entre cerca de 0,5 a cerca de 5,0. Todavía en otras modalidades el modo de partición débil en operación comprende operar bajo condiciones definidas por un coeficiente de partición en el rango entre 0,5 a cerca de 1,5.

00000

[0064] Por lo menos una modalidad de la presente invención suministra condiciones de operación del modo de partición débil que causan que el medio ligue entre por lo menos 1 a
5 cerca de 70 mg de producto por mL del medio, y que está definido por un coeficiente de partición de 0,3 a 20.

[0065] La figura 1 muestra los isotérmicos de absorción de producto para los modos del ligado-eluido, flujo continuo, y
10 partición débil, con el producto que se liga mediante el modo de partición débil como un intermedio claro en comparación con los modos de ligado-eluido y flujo continuo. Debido a que el valor del coeficiente de partición de producto (K_p) es la proporción de la concentración del producto absorbido con
15 respecto a la concentración del producto en la solución, los valores K_p para el modo de partición débil son también intermedios con respecto a los valores en los modos de ligado-eluido y flujo continuo.

20 **[0066]** La figura 2A ilustra las regiones de partición para los modos de ligado- eluido, partición débil, y flujo continuo como una función de la fuerza iónica, mostrando que el K_{imp} es más alto en el modo de partición débil que el modo de flujo continuo. Bajo las condiciones de ligado más
25 exigentes del modo de partición débil, una capacidad mayor de producto puede ser lograda, mayor que en el modo de flujo continuo, ya que las impurezas son ligadas de manera más fuerte, y más alto que en el modo de ligado-eluido, ya que el

00020

producto que se liga muy débilmente en comparación a las impurezas y no toma la mayoría de la capacidad de la resina. El coeficiente de partición de la impureza (K_{imp}) es mayor en las condiciones de ligado más exigentes, resultando en concentraciones más bajas de impurezas residuales en el grupo del producto del modo de partición débil en comparación con el grupo de producto del modo de flujo continuo. Las regiones de flujo continuo, partición débil y ligado-eluido en hidroxiapatita, como una función de concentración de fosfato y de NaCl, se muestran en la figura 2B

[0067] la tabla A resume las diferencias en las características entre los tres modos de ligado: ligado-eluido (B-E), partición débil (WP), y flujo continuo (FT).

Tabla A Características de los modos FT/WP/B-E			
	FT	WP	B-E
Kp	<0.1	0.1	>20
Limitación del exposición de carga	Impurezas 10-50 mg Prod/mL (típico) pero realmente dependiente de la pureza de la carga	Impurezas 50-500 mg Prod/mL (típico) pero realmente dependiente en la pureza de la carga	Producto + impurezas <100 mg Prod/mL
Volumen de carga	Moderada, para impurezas diluidas 10-20CVs	Muy alta para impurezas diluidas hasta 50CVs	Baja, ya que el producto se liga en adición a las impurezas 5-20CVs
[producto] en el eluato de carga	Igual a la concentración de carga a través de mucha parte de la carga	Retraso inicial, y luego y se iguala a la concentración de la carga a través de mucha parte de la carga	<5% de la concentración de la carga

00121

Residual [impurezas]	Baja	Muy baja	Dependiente de las condiciones de elución, volumen del grupo y capacidad
Producto ligado (Q)	<1 mg/mL	<10-20 mg/mL	>10-20 mg/mL
Región operativa	Rango relativamente amplio de condiciones	Ventana modesta de operación entre los modos FT y B-E	Condiciones de ligado exigentes para carga, rango amplio de condiciones de elución
Fases móviles	Isocrática	Isocrática	Cambia en la composición amortiguadora después de la carga lo que causa la elución.

[0068] El modo de partición débil también puede distinguirse de los modos de ligado- eluido y flujo continuo por sus cromatogramas, como se muestra en la figura 3. Inicialmente, los cromatogramas para los modos de flujo continuo y partición débil pueden parecer bastantes similares, el producto es recuperado en el efluente de columna y las fracciones son lavadas, bajo condiciones isocráticas. Sin embargo, distinciones sutiles pero significativas existen en los cromatogramas que pueden se usadas para distinguir estos modos, como se muestra en la figura 4. Existe un retraso en el perfil de representación inicial (>0,1 volúmenes de columna o CV) para el modo de partición débil en comparación con el modo de flujo continuo. Existe un perfil de lavado más lento en el modo de partición débil. Un pico de tira pequeña que contiene el producto puede

00122

estar presente (lo que corresponde a la resina que todavía
liga 10 - 50% de la concentración de producto de carga
después de la etapa de lavado), que puede ser recuperada de
la resina mediante aplicar un lavado con 1-5CV después de la
5 carga bajo condiciones isocráticas subsiguientes a la
recuperación del efluente de columna durante el ciclo de
carga.

[0069] La figura 5A muestra las tendencias generales en
10 los LRV contaminantes para los usuarios niveles de valores de
coeficiente de partición de un producto. Los LRV
contaminantes son relativamente bajos en condiciones de K_p
correspondientes a las operaciones de flujo continuo. Operar
bajo condiciones de K_p incrementante incrementa
15 significativamente los LRV en las fracciones de efluente de
columna antes de la presentación del contaminante. Como se
muestran en los ejemplos, operar con valor escape en mayores
o más altos mejora los LRV contaminantes en tanto como 2
logaritmos desde aquellos correspondientes a las condiciones
20 de flujo continuo estándar.

[0070] Incrementar el K_p típicamente incrementa tanto el
ligado del producto como el de los contaminantes a la resina.
El ligado más fuerte del contaminante con un K_p más alto
25 lleva aun LRV más grande en las fracciones del efluente de la
columna antes de la presentación del contaminante. Sin
embargo, el reto de la carga en el punto de la presentación
del contaminante disminuye con el incremento en el K_p a

medida que el producto inicia su competición con el contaminante para los sitios de ligado en la resina, como se represento esquemáticamente en la figura 5A mediante la curva de K_p alto. La región de partición del por lo tanto
5 corresponde a una ventana operativa que balancea la mejora en el LRV del contaminante con los requerimientos de la capacidad de columna para una separación dada.

[0071] El límite superior de K_p para la cromatografía de
10 partición débil también depende del reto de la carga de columna como se muestra en la figura 5B. El coeficiente de partición no tiene impacto sobre la recuperación del producto en valores que moldea las condiciones de flujo pasante. La recuperación de producto inicia su caída en valores altos de
15 K_p donde las condiciones de lavado isocrático no son efectivas para lavar el producto ligado de la columna en un número razonable de volúmenes de lavado. El grado de pérdida de producto debido al lavado inefectivo es sensible al exposición de carga, Lo mismo que la naturaleza en proporción
20 del contaminante en la carga. Así, el límite inferior de la región WP está definida por requerimientos de remoción de contaminante, mientras que el límite superior para una exposición de carga dado está definido por restricciones de recuperación o capacidad del producto.

25

[0072] En una o más modalidades de la invención, las condiciones de partición débil óptima puede ser identificadas

80125

usando la siguiente secuencia de experimentos, como se muestra en la figura 6:

(i) llevar a cabo una selección HTS (o experimentos de ligado en tandas estándar) para determinar los coeficientes de partición de producto K_p como una función de las condiciones operativas. Identificar la ventana operativa correspondiente a la región de partición débil ($0,1 < K_p < 20$) entre estos experimentos.

(ii) Preferiblemente, después de identificar la región de partición débil, uno puede llevar a cabo series de exploración en una columna a la pequeña escala con una exposición de carga similar a aquellos usados para la operación de flujo continuo estándar (aproximadamente 50 mg/ml). Uno puede adicionalmente sintonizar de manera fina la ventana operativa de partición débil con base en la remoción de contaminante y los valores de recuperación de producto de estos experimentos.

(iii) más preferiblemente, uno puede generar datos de presentación de contaminante para unas pocas condiciones K_p dentro de la región de partición débil. Con base en estos resultados, seleccionar un coeficiente de partición óptimo en la región de partición débil que suministre la mayor remoción de contaminantes en una exposición de carga aceptable.

(iv) Uno puede entonces más preferiblemente llevar a cabo series de cromatografías de partición débil bajo condiciones optimas de K_p y adicionalmente sintonizar de manera fina la exposición de carga y los volúmenes de lavado según se

0073

necesite para obtener la recuperación y la remoción de contaminantes optimas.

[0073] Una persona versada en la técnica podría usar estas instrucciones o una variación de ellas para definir fácilmente una etapa de cromatografía de partición débil que suministre una remoción de contaminante mejorada con exposiciones de carga comparables o mayores a las de los modos de flujos pasante o ligado/diluido de la cooperación de la columna. La estructura general discutida anteriormente puede, con ajustes menores si se requiere, ser aplicada para desarrollar una etapa de purificación en un sistema de intercambio iónico, de interacción hidrófoba, de hidroxiapatita, o multimodo que convine los elementos de cualquiera o todas de estas clases de interacciones.

2. Técnicas de separación

[0074] El modo de partición débil puede ser usado en conjunto con cualquier resina o medio cromatográfico para la separación de un producto de las impurezas. En una modalidad, el medio es un medio intercambio iónico cargado. El intercambio iónico es una forma de cromatografía que se para de acuerdo a la carga neta. La separación de las moléculas ocurre como un resultado de la competencia entre el producto cargado de interés y los iones contrarios para los grupos delirándose opuestamente cargados en el medio de intercambio iónico. Las interacciones de ligado entre el producto y un

00123

medio de intercambio iónico dependen de la carga neta del producto. La carga neta es dependiente de pH y de la fuerza iónica del medio, lo que afecta las características de carga diferentes de los aminoácidos y otros competentes en la superficie expuesta de las moléculas de producto de interés.

[0075] Las resinas de intercambio iónico que pueden ser usadas en la invención incluyen resina de intercambio aniónico y resinas de intercambio catiónico. Las resinas de intercambio aniónico pueden emplear sustituyentes tales como dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetilo (TMAE), amino etilo cuaternario (QAE) y grupos de amina de amina cuaternaria (Q). El intercambio catiónico puede emplear sustituyentes tales como carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfunato(S). Las resinas de intercambio iónico celulósicas tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 están disponibles de Whatman Ltd. Maidstones, Kent, U.K. Los intercambiadores iónicos reticulados y con base en sefalex también son conocidos. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM- y s-sefalex y DEAE, Q-, CM-y-sefaroza y la sefaroza están todos disponibles de Amersham Biosciences, Piscataway, Nj. Adicionalmente, tanto el copolímeros de estilen glicol-metacrilato derivados de DEAE y CM tales como TOYOPEARL[™] de DEAE-650 So CM TOYOPEARL[™] CM-650 so M están disponibles de Toso Haas co. Filadelfia, PA.

[0076] En ciertas modalidades de la invención, el modo de partición débil, es usado con una resina de cromatografía de

interacción hidrófoba (HIC) para la purificación de producto. El HIC es una técnica para separar moléculas con base en la hidrofobicidad. Generalmente, las moléculas de muestra en un amortiguador de alto contenido en sal son cargadas en la resina HIC. La sal en el amortiguador interactúa con las moléculas de agua para reducir la disolución de las moléculas en solución, exponiendo así las regiones hidrófobas en las moléculas de muestra que son absorbidas consecuentemente por el medio HIC. Entre más hidrófoba es la molécula, menos sal se requiere para promover el ligado. Las interacciones de ligado entre las moléculas de producto y el medio HIC dependen entonces de las condiciones tales como pH, fuerza iónica, y concentraciones de sal del medio.

15 [0077] Varias resinas HIC comercialmente disponibles que pueden ser usadas en la invención incluye resinas que comprenden una matriz base (por ejemplo agarosa reticulada o material de copolímeros sintéticos) al cual los ligandos hidrófobos (por ejemplo grupos alquilo o arilo) son acoplados. Ejemplos que incluyen fenil sefarosatm 6 FAST FLOWTM (farmacia LKB Biotechnology, AB Suecia); Fenil sefarosatm de alto rendimiento (farmacia LKB Biotechnology, AB Suecia); octil sefarosatm de alto rendimiento (farmacia LKB Biotechnology, AB Suecia); FractogelTM EMD fenilo (E.Merck, Alemania); macro-prepTM metilo o macro-prepTM soporte de T-butilo (Bio-Rad, CA); WP HI-propilo (C₃)TM (J.T.Baker, NJ); y TOYOPEARLtm éter, fenilo o butilo (Toso haas, PA).

[0078] En otras modalidades de la invención, el modo de partición débil es usado con cromatografía de hidroxapatita para la purificación del producto. La cromatografía de hidroxapatita es una técnica que utiliza un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de la formula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, tanto en la matriz como en el ligando. Los grupos funcionales consisten de pares de iones de calcio cargados positivamente (sitios C) y agrupaciones de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). La interacción de ligado entre el producto y el medio de hidroxapatita depende de las condiciones tales como pH, fuerza iónica, y concentraciones de excipiente, tales como concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina y concentraciones de HEPES del medio. Varias resinas cromatografías de hidroxapatita están disponibles comercialmente y pueden ser usadas en la invención.

[0079] En modalidades adicionales de la invención, el modo de partición débil es usado con una resina de cromatografía por afinidad de metal inmovilizado (IMAC) para la purificación del producto. El IMAC esta basado en la interacción entre los iones de metal de transición helados inmovilizados en la resina y las cadenas laterales de imidazol de los residuos de histidina en el producto etiquetado de interés. La separación de las moléculas ocurre como resultado de la competencia entre el producto etiquetado de interés y los contra ligandos para los grupos de metal en la resina IMAC. Las interacciones

del ligado entre el producto y el medio IMAC cargado con metal depende de las condiciones tales como niveles de contra ligando, tales como concentraciones de imidazol, y fuerza iónica del medio. Varias resinas IMAC están disponibles
5 comercialmente y pueden ser usadas en la invención.

3. Productos para la purificación

[0080] La invención puede ser usada para la purificación
10 escala comercial de diversos productos de interés, incluyendo las proteínas de ocurrencia natural, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas, interlucinas, hormonas, y enzimas terapéuticas. En una modalidad, la proteína que sufre la purificación puede
15 comprender una o más dominios de anticuerpo de inmunoglobulina constantes. En una modalidad, la proteína puede también comprender un dominio de inmunoglobulina de anticuerpo único o múltiple variable. En otra modalidad, la proteína que contiene FC puede comprender un anticuerpo. Las
20 proteínas pueden ser derivadas de diversas fuentes, incluyendo líneas celulares anfitrionas o carióticas o eucarióticas recombinantes cultivadas.

[0081] Las preparaciones de anticuerpo de la invención puede
25 ser aislada de un número de fuentes influyendo, pero sin limitarse a, suero de animales inmunizados, fluido de asitas, sobrenadantes de hibridoma o mieloma, medios acondicionados derivados del cultivo de una línea de células recombinante

00000

que expresa la molécula de anticuerpos y de todos los extractos celulares de células productoras de anticuerpo. En una modalidad de la invención, los anticuerpos del medio de cultivo de células acondicionadas de una variedad de anticuerpos que producen las líneas celulares recombinantes son purificadas. Aunque uno puede esperar algunas variaciones de líneas celulares a líneas celulares y entre diversos productos de anticuerpos, con base en la descripción aquí, está bien dentro del propósito de una persona versada en la técnica adaptar la invención aquí a una combinación particular de proteína de anticuerpo y línea de célula productora.

[0082] Para propósitos de ilustración solamente, esta invención fue aplicada a la purificación de varios anticuerpos del isotipo IGG. Más específicamente, esta invención fue aplicada a la purificación de un anticuerpo monoclonal anti-A beta humanizado, un anticuerpo-GDF,8, y un anticuerpo anti-IL-13 monoclonal humanizado.

20

4. Condiciones de cargado y capacidades

[0083] Antes de cargar el fluido que contiene el producto y las impurezas en el medio, puede ser necesario identificar la región de partición débil mediante encontrar las condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos un 1 mg de producto por mL de medio. En una modalidad, las condiciones operativas encontradas que causan que el medio

25

00131

ligue a por lo menos 5 mg de producto por mL de medio. En otra modalidad, las condiciones operativas encontradas causan que el medio ligue `por lo menos 10 mg de producto por mL de medio. En otras modalidades, las condiciones operativas encontradas causan que el medio ligue por lo menos 20 mg de producto por mL de medio. Alternativamente, la región de partición débil es identificada mediante encontrar las condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1. En ciertas modalidades, las condiciones operativas encontradas están definidas por un coeficiente de partición en el rango entre 0,2 acerca de 20,0. En otras modalidades, las condiciones operativas encontradas están definidas por un coeficiente de partición en el rango de cerca de 0,2 acerca de 10,0. Todavía en otras modalidades, las condiciones operativas encontradas están definidas por un coeficiente de partición en el rango de 1,0 acerca de 5,0, en el rango de cerca de 0,5 acerca de 5,0, o en el rango de 0,5 acerca de 1,5. En modalidades adicionales, la región de partición débil es identificada mediante encontrar las condiciones operativas que causan que el medio ligue por lo menos 1 a acerca 70 mg de producto por mL de medio y que este definida por un coeficiente de partición de 0,3 a 20.

25 **[0084]** Una persona versada en la técnica podrá reconocer que las condiciones operativas apropiadas dependerán de la escogencia del medio seleccionado para la purificación del producto. En ciertas modalidades, las condiciones operativas

00132

comprenden niveles de pH y fuerzas iónicas. En otras modalidades, las condiciones operativas comprenden adicionalmente concentraciones de sal. Todavía en otras modalidades, las condiciones operativas comprenden
5 adicionalmente niveles de excipientes tales como concentraciones de fosfato y concentraciones de calcio. En algunas modalidades, las condiciones operativas comprenden niveles de contra ligandos, tales como concentraciones de imidazol, y niveles de pH.

10

[0085] Una etapa de selección puede ser usada para identificar las condiciones operativas para el modo de partición débil. Tal etapa de selección puede influir o podría incluir estudios de ligado por tandas o estudios de
15 ligado en columna. Los estudios de ligado en columna pudieran incluir estudios de elución por gradiente o estudios de elución isocrática. Por ejemplo, una persona versada en la técnica puede determinar que amortiguador o sal es apropiada para la proteína en particular qué está siendo purificada y
20 para las condiciones operativas que están siendo identificadas. La concentración optima del amortiguador o la sal seleccionados pueden entonces ser determinados mediante, por ejemplo, correr un gradiente del amortiguador o sal seleccionados por una columna a la cual un fluido de carga
25 que comprende el producto hacer purificado y las impurezas han sido aplicado. Las fracciones del efluente de la columna pueden ser recolectadas y analizadas para determinar la concentración de amortiguador o sal en el cual el producto

ligado es de por lo menos 1 mg de producto por mL de medio o
alternativamente, en la cual el coeficiente de partición para
el producto es de por lo menos 0,1. En ciertas modalidades de
la invención, el coeficiente de partición es medido entre 1 y
5 10 mg/ml de exposición de carga con una proporción de fase
(volumen de liquido respecto a volumen de resina) de 3 a 6 en
un experimento de ligado por tanda.

[0086] Una vez que las condiciones operativas son
10 determinadas, las condiciones del fluido de carga y/o del
medio puede ser ajustada de acuerdo a ello. Por ejemplo, el
medio puede ser equilibrado mediante el lavarlo con una
solución que lo llevara a las condiciones operativas
necesarias en el modo de partición débil. El fluido de carga
15 puede también ser intercambiado dentro de un amortiguador
apropiado o cargado en amortiguador en preparación para el
modo de partición débil. El amortiguador de carga puede ser
igual o un amortiguador diferente al del amortiguador de
equilibrio.

20

[0087] En una modalidad, la fuerza iónica del fluido de carga
no es más de 100 mm. En otra modalidad, la fuerza iónica del
fluido de carga no es más de 50 mm. En otra modalidad, la
fuerza iónica del fluido de carga no es más de 25 mm. Todavía
25 en otra modalidad, la fuerza iónica del fluido de carga no es
más de 10 mm.

00121

[0088] El fluido de carga puede ser pasado a través de un medio de separación que es empacado en una columna de lecho fluidizado/expandido que contiene la matriz de fase sólida, y/o en un formato de tandas en donde la matriz de fase sólida es mezclada con el fluido de carga durante un cierto tiempo. Después del que el fluido de carga es pasado por el medio, el medio es lavado finalmente con un volumen de lavado esencialmente isocráticamente. El producto purificado puede ser obtenido de cualquier lavado esencialmente isocrático y agrupado con el producto purificado del fluyente de la columna durante el ciclo de carga. Después de la etapa de lavado opcional, el medio puede opcionalmente ser extraído y regenerado. Este procedimiento es llevado a cabo típicamente regularmente para minimizar la construcción de impurezas sobre la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar el medio al fin de evitar la contaminación del producto con microorganismos.

[0089] Concentraciones de alta carga y volúmenes de carga son posibles con el modo de partición. En una modalidad, la concentración de producto en el fluido de carga es de por lo menos 1 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra modalidad, la concentración de producto en el fluido de carga es de por lo menos 5 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra modalidad, por lo menos 50 mg de producto por ml de fluido de carga, y en otra modalidad, por lo menos 100 mg de producto por ml de fluido de carga. El producto

00125

purificado puede ser recuperado desde hasta 50 CVS de fluido de carga pasado a través del medio.

[0090] Los retos de alta carga también son posibles con el modo de partición débil. En una modalidad, la carga en el medio puede estar en una exposición de carga de por lo menos 10 mg de producto por ml de medio. En otras modalidades, la carga del producto en el medio es de por lo menos 50 mg de producto por ml de medio. En ciertas modalidades, la carga del producto en el medio es de por lo menos 100 mg de producto por ml de medio. En otras modalidades, la carga en el medio puede ser una exposición de carga de por lo menos 500 mg de producto por ml de medio. Todavía en otras modalidades, la carga en el medio puede estar en una exposición de carga de por lo menos 1000 mg de producto por ml de medio.

5. Remoción de impurezas

[0091] El modo de partición débil a mostrado ser útil para remover todos los tipos de impurezas de las preparaciones de producto, incluyendo proteínas de células anfitrionas, ácidos nucleicos, variantes de producto, incluyendo producto agregado y especies de alto peso molecular, endotoxinas, virus, y contaminantes de proteína A de etapas de purificación anteriores.

00136

[0092] En una modalidad de la invención, la concentración de las proteínas de células anfitrionas presentes en el producto modificado no es más de cerca de 500 ng de proteínas de células anfitrionas por mg de producto. En otras modalidades, la concentración de las proteínas de células anfitrionas puede reducirse a no más de 250 ng por mg de producto, y en otras modalidades, a no más de 100 ng por mg de producto. En ciertas modalidades, el logaritmo de valor de remoción de las proteínas de células anfitrionas es de por lo menos 1,0, y en otras modalidades, el logaritmo de valor de remoción de las proteínas de células anfitrionas es de por lo menos 2,0, y en otras modalidades, el logaritmo de valor de remoción de las proteínas de célula anfitrionas es de por lo menos de 3,0.

[0093] En una modalidad de la invención, la concentración de proteína A presente en el producto purificado no es más de cerca de 100 ng de proteína A por mg de producto. En algunas modalidades, la concentración de proteína A puede ser reducida a no más de 50 ng por mg de producto, y en otras modalidades, a no más de 10 ng por mg de producto. En ciertas modalidades, el logaritmo del valor de remoción de proteínas A es de por lo menos 1,0, y en otras modalidades, el logaritmo de valor de remoción de vitamina A es de por lo menos 2,0, y en otras modalidades, el logaritmo de valor de remoción de proteína A es de por lo menos 3.0.

[0094] En otra modalidad de la invención, las impurezas virales son removidas del producto purificado. En ciertas

00137

modalidades, el logaritmo de valor de remoción de virus es mayor a 1,0, en otras modalidades, mayor a 2,0, y en otras modalidades, mayor a 3,0.

5 [0095] En algunas modalidades de la invención, impurezas de ácidos nucleicos son removidos del producto purificado. En ciertas modalidades, la cantidad de ácido nucleicos presentes en el producto purificado puede reducirse a no más de 1 ng de ácidos nucleicos por mg de producto.

10

[0096] En modalidades adicionales, la concentración e variantes de proteína en el producto purificado no es más de cerca de 10%. En algunas modalidades, la concentración de variantes de proteína puede ser reducida a no más de cerca
15 del 5%, y en algunas modalidades, a no más de cerca del 2%, y en otras modalidades a no más del 0,5%.

[0097] Bajo condiciones de ligado estrictas o exigentes del modo de partición débil, el medio de separación remueve por
20 lo menos 90% de las proteínas de células anfitrionas, ácidos nucleicos, variantes de proteína, endotoxinas, e impurezas de proteína A. En algunas modalidades, el medio remueve por lo menos el 99% de las impurezas, y en otras modalidades, el medio remueve por lo menos 99,9% de las impurezas.

25

6 Etapas opcionales adicionales

00000

[0098] El método de purificación de la invención puede ser usado en combinación con otras etapas de purificación de proteína. En una modalidad de la invención, una o más etapas precedentes a la etapa de partición débil pueden ser deseables para reducir la exposición de carga. En otra
5 modalidades de la invención, una o más etapas de purificación después de la etapa de partición débil puede ser deseables para remover contaminantes o impurezas adicionales.

10 [0099] El procedimiento de purificación por partición débil descrito puede opcionalmente ser combinado con otras etapas de purificación, incluyendo pero sin limitarse a, cromatografía por proteína A, cromatografía por afinidad, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía por
15 afinidad con metal inmovilizado, cromatografía por exclusión de tamaño, diafiltración, ultra filtración, filtración para remoción viral, y/o cromatografía por intercambio iónico. Las etapas de purificación opcionales precedentes y/o posteriores a la etapa de partición débil pueden también ser operadas en
20 el modo de partición débil, o en otros modos, tal como el modo de ligado-eluido o el modo de flujo continuo.

[0100] En una modalidad, antes de la etapa de purificación por partición débil, el medio de cosecha puede opcionalmente
25 ser purificado inicialmente por una etapa de cromatografía por proteína A. Por ejemplo, PROSEP-ATM (Millipore, U.K.), que consiste en proteína A acoplada covalentemente a vidrio con poro controlado, puede ser empleada. Otras formulaciones de

n^o 3

proteína A útiles incluyen la proteína A sefarosa FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, piscataway, NJ), TOYOPEARL™ 650; proteína proteína (tosohaas co., Filadelfia, PA), y columna MABSELECT™ (Mmersham biosciences, piscataway, NJ).

5

7 Amortiguadores zwiteriónicos usados en paralelo con la cromatografía de proteína A y con cromatografía por intercambio iónico.

10 **[0101]** En ciertas modalidades, un fluido que contiene el producto es eluido desde una columna de proteína A usando un amortiguador de elución de baja fuerza iónica. El pH y la conductividad del fluido que contiene el producto es ajustada entonces usando el amortiguador de neutralización, que
15 resulta en no más de 20 mm de fuerza iónica del fluido que contiene el producto. El fluido de carga resultante es entonces pasado por un medio de intercambio aniónico o un medio de hidroxapatita que opera bajo condiciones de modo de partición débil. En ciertas modalidades, el fluido de carga
20 es pasado por un medio de intercambio aniónico sin la necesidad de diafiltración. En algunas modalidades, el pH y la conductividad del fluido que contiene el producto son ajustados usando un amortiguador de neutralización que resulta de no más de 40 mm de fuerza iónica del fluido que
25 contiene el producto. En otras modalidades, el pH y la conductividad del fluido que contiene el producto son ajustados usando un amortiguador de neutralización que resulta en no más de 60 mm de fuerza iónica del fluido que

p0110

contiene el producto. Todavía en otras modalidades, el pH y la conductividad del fluido que contiene el producto son ajustados usando un amortiguador de neutralización que resulta en no más 80 mm de fuerza iónica del fluido que
5 contiene el producto.

[0102] Los amortiguadores que pueden ser usados para la elución desde la columna de proteína A incluyen amortiguadores que comprenden moléculas con un grupo aniónico
10 cargado con un pKa de 2 a 5. Tales amortiguadores de elución podrían comprender adicionalmente moléculas con un grupo catiónico cargado con pK de 6,5 a 10. En una modalidad, el amortiguador de elución comprende moléculas que son zwitteriones con pH entre 4 y 9 tales como glicina; 1,4-
15 piperazinabis-(ácido hetanosulfónico); glicil glicina; ácido ciclo pentanotetra-1,2,3,4-carboxílico; ácido N,N-bis (2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfónico; ácido 2-(N-morfolino)propano-sulfónico; ácido N.tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico; ácido N-2-
20 hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropano sulfónico; N-tris(hidroximetil)metilglicina; glicinamida; N,N-bis (2-hidroxietil)glicina; N-tris(hidroximetil)metil-2-aminopropano ácido sulfónico; o N-glicil-glicina.

25

[0103] La elución de una columna de proteína A con un amortiguador zwitteriónica suministra la ventaja de fuerza iónica baja sobre algún grado de neutralización. La fuerza

001/1

iónica baja del amortiguador no impacta adversamente la operación de las columnas de intercambio iónico subsiguientes, incluyendo las columnas de hidroxiapatita. Altos niveles de fuerza iónica disminuirán el ligado de las impurezas a las columnas de intercambio iónico, lo que puede disminuir la eficiencia general de la purificación. Las soluciones con fuerza iónica menores son preferidas para cargas sobre columnas de intercambio iónico, tal como el esfuerzo ión ya que el esfuerzo iónico puede ser incrementado fácilmente con la adición de soluciones de sal concentradas; disminuir la fuerza iónica de las soluciones no es fácil. Sorprendentemente, existen amortiguadores que tiene un pK bajo que permite el uso con niveles de pH bajos útiles en las etapas de elución con proteína A, pero que también tienen un segundo pK que permite el uso de niveles de pH mayores útiles en la cromatografía de intercambio iónico; estos amortiguadores, si son usados con un segundo pH apropiado, tiene poca carga efectiva durante la operación de la etapa del intercambio iónico subsiguiente a la etapa de proteína A.

[0104] El amortiguador zwitteriónico que tiene un pKa cercano al del pH de elución preferido para la proteína A (entre pH 2 y 5, preferiblemente entre 2,5 y 4,0) permite que el amortiguador sea usado para mantener el pH cerca al pI del amortiguador y a eluir la columna. Los amortiguadores zwitteriónicos que también tiene un pKa cercano a aquel de la operación de una columna de intercambio iónico subsiguiente (pH 5,5 a 11) permitirían que el amortiguador controle el pH

00112

en este rango de pH lo mismo que en el rango de pH de la elución de la proteína A. el uso de un compuesto único tanto para la elución de la columna de la proteína A con bajo pH y para mantener el pH más alto útil en la cromatografía de intercambio iónico simplifica la operación de ambas etapas y también simplifica la composición del grupo de producto después de la neutralización.

[0105] En una modalidad adicional de la invención, un amortiguador zwitteriónico con pKa1 y con pKa2 puede eluir una columna de proteína A en niveles de pH dentro de una unidad de pH del pKa1. Adicionalmente, si el grupo de proteína A es neutralizado con una solución básica del amortiguador zwitteriónico a un segundo pH dentro de una unidad de pH del pKa2, el amortiguador zwitteriónico se capacita de mantener el pH de la solución. Si el segundo pH está por debajo de aquel del pKa2, el amortiguador permanece zwitteriónico y contribuye poco a la fuerza iónica general de la solución. Por ejemplo, un amortiguador zwitteriónico con concentración X a un pH igual al del pKa2 contribuirá a la fuerza iónica general solamente en $x/2$. Un amortiguador zwitteriónico con una concentración x en una unidad 1 de un pH por debajo del pKa2 del amortiguador tendrá una fuerza iónica de un décimo de x. esta reducción en la fuerza iónica es significativamente útil para la operación de cromatografía mediante intercambio iónico.

[0106] La existencia de amortiguadores que tengan un pKa1 útil para la elución de las columnas de propina A y un pKa2 útil para la operación de la cromatografía por intercambio iónico no es obvio; en que el pKa1 de estos amortiguadores no se reporta común mente. Los amortiguadores que son usados comúnmente en niveles de pH cerca al del pKa2 y que no se conocen por aquellos versados de la técnica de la cromatografía para ser útiles para la elución desde una columna de proteína A. Adicionalmente, aunque la utilidad de estos amortiguadores para la elución desde las columnas cromatografías de proteína A no se ha realizado en general, también se ha visto que estos amortiguadores zwitteriónicos tendrían una utilidad adicional como amortiguadores para columnas de intercambio iónico sustituyentes a las columnas de proteína A porque ellos contribuyen con menos fuerza iónica al grupo de proteína A neutralizada.

C Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para propósitos ilustrativos solamente.

[0107] Los ejemplos se ha provisto para los tres modos de cromatografía (intercambio aniónico, interacción hidrófoba y hidroxapatita, usando tres anticuerpos mono clonares diferentes. Cuatro series separadas de experimentos se describen, cada uno representa un aparejamiento diferente del modo de cromatografía y el anticuerpo monoclonal que va hacer

00001

purificado. Los estudios de selección e iniciales se presentan primero los que determina el coeficiente de partición y/o la concentración del producto ligado a la resina bajo varias condiciones de solución, definiendo así
5 las regiones operativas de la partición débil (WP) y del modo de flujo continuo (FT). Varios estudios de columna son entonces resumidos con datos sobre la recuperación de producto y la remoción de impureza. La recuperación de productos son excelentes para las series de la columna WP, y
10 los niveles de impurezas son menores que en los estudios FT correspondiente. Las series WP fueron conducidas con exposiciones de carga mayores a la resina que en los estudios FT.

15 **[0108]** Los niveles de proteína A residuales en las muestras de ensayo fueron medidas usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a encima de proteína A (ELISA). La cantidad de agregado con peso molecular alto fue medida usando un ensayo de cromatografía por elución de tamaño
20 analítico (SEC). Los niveles de las proteínas en las células anfitrionas (HCPs) fueron medidos usando un HCP ELISA. Todas las selecciones y estudios de columna fueron conducidos a temperatura ambiente.

Serie 1 -intercambio aniónico usando TMAE-HiCap (M) y Mab-AAB

25

Experimento 1.1- tamiz de alto rendimiento para establecer las condiciones WP y FT.

00115

[0109] Una selección de alto rendimiento (HTS) se llevo a cabo para identificar las condiciones de la partición débil y del flujo continuo para el medio Mab-AAB con TMAE-HiCap (M). Esta selección varió la concentración de cloruro de sodio y del pH para determinar su efecto en el grado de ligado de Mab-AAB y el proceso relacionado con las impurezas (proteína A y HCP) para el medio de TMAE.

[0110] 50 μ L de TMAE HiCap fue agregado a cada pozo de una placa de filtro con 96 pozos. Cada pozo fue equilibrado en soluciones hechas hasta de 50 mm de glicina y una cantidad variable de amortiguador tri(dependiendo de la cantidad necesaria para la neutralización del pH especificado en la tabla 1.1.1) y cloruro de sodio (especificado en la tabla 1.1.2). El pH vario entre 7,6 y 9,0 y el cloruro de sodio vario entre 0 mm a 80mM.

[0111] Las soluciones amortiguadoras usadas en cada fila fueron diluidas sobre un sistema de pipeteado automático (Tecan 100RST). La solución de partida para los amortiguadores se hizo de 500 mm de glicina acidificada con HCl hasta un pH 3.0 y subsiguientemente neutralizada con una base tris al 2M hasta niveles de pH indicados en a tabla 1.1.1. Esta titulación resulto en un nivel de tris que dependía del pH del amortiguador. El pH del amortiguador fue medido en 1 a 10 diluciones de concentración de amortiguador de partida, lo que correspondió a la dilución hecha por el sistema de pipeteado automático. Como resultado de la

00146

acidificación de la glicina hasta un pH de 3,0, el amortiguador contribuye cerca de 10 mm de fuerza iónica a la solución final. Dos con exposiciones de carga fueron hechos para la resina: 5 mg/mL para medir el coeficiente de partición, K, y 122 mg/mL para medir la capacidad de la resina en la remoción de impurezas y el producto ligado, Q, en equilibrio con una solución de proteína en una concentración aproximadamente igual a la concentración de la carga de la columna.

10

Tabla 1.1.1: tipo amortiguador y pH objetivo en cada pozo.

	Todas las columnas
A	50 mm glicina, 8.8 mm tris, pH 7.6
B	50 mm glicina, 13.6 mm tris, pH 7.8
C	50 mm glicina, 16.0 mm tris, pH 8.0
D	50 mm glicina, 19.6 mm tris, pH 8.2
E	50 mm glicina, 28.4 mm tris, pH 8.4
F	50 mm glicina, 37.2 mm tris, pH 8.6
G	50 mm glicina, 64.0 mm tris, pH 8.8
H	50 mm glicina, 100 mm tris, pH 9.0

Tabla 1.1.2: niveles de NaCl (en mM) y retos de proteína (mg/mL) en cada pozo.

15

Todas las filas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
MAB-AAB (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

00147

[0112] En la primera etapa del experimento HTS, cada pozo fue equilibrado en las condiciones de NaCl y pH descritas en las tablas 1.1.1 y 1.1.2 en una proporción de volumen de fase de 6:1 (300µL de solución: 50µL de resina). La placa fue
5 agitada durante 20 minutos permitiendo que se alcance el equilibrio. La solución fue entonces removida mediante centrifugar la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio fue repetido tres veces.

10 [0113] EN la segunda etapa, la resina en cada pozo fue retada con una solución de MAb-AAB concentrada hasta 5 mg/mL de resina con una proporción de volumen de 6:1 (300µL de solución: 50µL de resina) a una concentración de NaCl apropiada y a un pH apropiado. Una solución de 36 mg/mL de
15 Mab-AAB en 1 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.0 rociada con 300ppm de proteína fue usada como solución de partida. La placa cargada fue agitada durante 20 minutos, permitiendo que la resina y la solución se equilibrará. El sobrenadante fue removido de la placa de filtro mediante centrifugación y
20 recolectado en una placa de recolección. La concentración de proteína en el sobrenadante en cada pozo fue determinada mediante absorbancia en A280mM.

[0114] En la tercera etapa, la resina fue lavada mediante
25 agregar soluciones de las condiciones de NaCl y pH especificadas dadas en la tabla 1.1.2. El sobrenadante fue removido después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta

001'3

etapa, se agrega NaCl al 2M para remover la proteína restante que estaba ligada a la resina. Los coeficientes de partición fueron calculados para cada pozo usando la masa eluida de las etapas 3 y 4 y la concentración del producto de la etapa dos y se muestran en la tabla 1.1.3. Un gráfico de contorno del logaritmo del coeficiente de partición como función del pH y del cloro se muestra en la figura 7.

Tabla 1.1.3 coeficientes de partición (K) para la selección de HTS de los 96 pozos para el MAB_AAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.22	0.32	0.35	0.17	0.24	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.17	0.16
B	0.37	0.36	0.38	0.25	0.24	0.08	0.28	0.26	0.22	0.24	0.18	0.16
C	0.63	0.48	0.47	0.27	0.15	0.20	0.31	0.28	0.26	0.20	0.23	0.16
D	1.24	1.12	0.68	0.36	0.30	0.17	0.42	0.39	0.34	0.23	0.23	0.18
E	3.24	1.89	1.05	0.59	0.35	0.15	0.68	0.58	0.41	0.29	0.21	0.18
F	8.37	3.37	1.56	0.61	0.31	0.32	0.87	0.74	0.51	0.32	0.25	0.21
G	18.36	9.49	3.16	0.82	0.49	0.34	0.91	0.88	0.69	0.39	0.24	0.20
H	125.73	23.79	6.58	1.23	0.58	0.43	1.18	1.02	0.78	0.42	0.27	0.24

[0115] Como se muestra en la tabla 1.1.3, el valor Kp puede ser usado para describir regiones en donde el MAB-AAB se liga al medio TMAE con diferentes fuerzas. Estas regiones se pueden visualizar más claramente en la figura 7. la fuerza del MAB-AAB ligando al medio TMA puede ser manipulada mediante varias las condiciones de pH y concentración de cloro en el flujo continuo ($K \leq 0,1$), en la partición débil ($0,1 < K < 20$), y las zonas de ligado ($K \geq 20$).

[0116] El sobrenadante de la etapa de carga de todos los pozos de cada zona fueron muestreados y sometidos a análisis por proteína A. los resultados del ensayo de esta muestra se resumen en la tabla 1.1.4. Hay una región de pH y

00113

conductividad en donde la etapa de cromatografía TMAE
suministra una remoción de proteína A muy significativa con
pérdida de proteína limitada en la resina. Esta región se
encontró que está cercanamente correlacionada con el valor de
5 coeficiente de partición, Kp, y no con cualquier pH
especifico o concentración de cloro especifica (ver figura
8).

**Tabla 1.1.4 logaritmo de valores de remoción de proteína A
10 (LRV) para los datos de ligado del MAB-AAB de las selecciones
HTS.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.11	1,89	2.12	1.85	1.22	1,00	1.63	1.02	1.00	0.92	0.85	1.02
B	2.79	2.37	2.42	1.96	1.23	1.13	1.77	1.81	1.22	0.85	0.94	1.52
C	>3.05	>3.03	2.74	2.16	1.37	1.11	2.25	2.15	1.96	1.16	1.06	0.95
D	>3.41	>2.98	>3.06	2.50	1.94	1.18	3.39	3.11	2.57	1.41	1.02	0.89
E	>2.87	>2.93	>3.01	>2.95	2.13	1.75	>3.09	3.27	3.09	1.66	1.89	0.99
F	>2.64	>2.89	>2.99	>3.11	2.29	1.82	>3.07	>3.11	>3.15	2.19	1.24	0.84
G	>2.33	>2.58	>2.89	>3.07	2.41	2.14	>3.09	>3.11	>3.14	2.80	1.46	0.85
H	>1.63	>2.36	>2.76	>3.01	2.86	2.37	>2.98	>3.05	>3.15	3.16	3.45	0.85

*Experimento 1.2- series de columna bajo condiciones de flujo
continúo.*

15

[0117] El siguiente experimento fue llevado a cabo en el modo
de flujo continuo (FT), en donde el Mab-AAB interactúa
solamente muy débilmente con la columna. Dos series fueron
llevadas a cabo con exposiciones de carga de 110 mg/ml y 200
20 mg/ml de resina.

[0118] Para todas las series de cromatografía por
intercambio de anión para el TMAE (HiCapM) descritas en los
experimentos de la serie 1, las siguientes condiciones fueron

00170

usadas (excepciones se anotan en las descripciones experimentales individuales)

Índice de flujo operacional- 150-3Cm/hr

5 Equilibrio 1-50 mm de Tris, NaCl al 2.0M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Equilibrio 2 -según se especificó, aproximadamente equivalente al pH de la carga y al contenido de cloro.

Lavado poscarga-como se especifico, aproximadamente
10 equivalente al pH de carga y el contenido de cloro

Amortiguador de extracción-50 mm de tris,NaCl al 2.0M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Cromatografía de selección de Mab con proteína A

15

[0119] El cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal fue purificado a escala piloto usando la columna Mabselect (2,389mL) conectada a un sistema de cromatografía milipore K-prime 400. La columna mabselect de proteína A fue equilibrada
20 con cinco volúmenes de columna de 50 mm de Tris/150 mm NaCl, pH 7,5 a un índice de flujo de 300Cm/hr. La columna fue entonces cargada a una cargada de aproximadamente 40 mg de producto/ mm de resina esto fue seguido por un lavado de 5CV en NaCl al 1M, 50 mm de Tris, pH 7,5 y un lavado de 5CV que
25 contiene 10 mm de tris, 75 mm NaCl, pH 7,5. La columna fue entonces eluida usando 50 mm de glicina, 75 mm de NaCl, pH 3,0. El grupo del producto fue neutralizado hasta un pH de

00151

7,6 usando tris al 2M y pH 8,5. El pico neutralizado tenia una concentración de cloro de aproximadamente 90mM.

Cromatografía TMAEHiCap(M)

5

[0120] El grupo de proteína A neutralizada fue purificado adicionalmente sobre la etapa de TMAE con el equilibrio carga, y soluciones de lavado con un pH de 7,5 con 50 mm de tris y 75 mm de cloruro de sodio. 5 volúmenes de columna del lavado fueron usados. Las dimensiones de la columna y los exposiciones de carga para estos dos estudio fueron: serie 1: altura del lecho 7,0cm de diámetro por 20,6cm de altura (volumen-793mL) con una concentración de carga de 11,9 mg/mL, y serie 2: lecho de 7,0cm de diámetro x 13cm de altura (volumen- 500mL) con una concentración de carga de 17,6 mg/mL.

[0121] Estas condiciones fueron estudio de ligado portándose en la región de flujo continuo (FT) (tabla 1.2.1). Los estudios de ligados de tandas fueron usados para medir el coeficiente de partición (Kp) y el producto ligado fue determinado por la proteína en la extracción de columna mediante usar absorbancia UV. Este método para determinar el producto ligado subestima típicamente la cantidad de producto ligado durante la carga debido a la elución isocrática del producto durante el lavado. Los niveles de proteína A, HCP y HMW en la carga y el grupo de producto fueron medidos, y el grado de remoción fue calculado. Los resultados se presentan

en la tabla 1.2.1. Existe una remoción pobre de proteína A y HMW y una reducción modesta en los niveles de HCP.

Tabla 1.2.1: remoción de HCP, proteína A, y HMW bajo condiciones de flujo continuo.

serie	Exposición de carga (mg/mL)	Coefficiente de partición (Kp)	Producto ligado (mg/mL de resina)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (veces)	Recuperación (%)
1	110	0.17	1.4	2.3	0.1	-	96
2	200	0.17	3.3	2.0	<0.1	1.5	96

* Los niveles de impurezas fueron 38,5ppm proA y 51,943ppm HCP (serie 1), 8,8ppm proA y 25,398ppm HCP(serie 2).

Experimento 1.3- serie de columna bajo condiciones de partición débil (reto alto de producto)

Cromatografía de intercambio de anión TMAE (HiCap M)

[0122] Varias series en la Mabselect de proteína A fueron llevadas acabo esencialmente como se describió en el experimento 1.2 para general el material de carga para estas series. El grupo de anticuerpos purificado parcialmente de la etapa de proteína A se purifica adicionalmente sobre la columna TMAE. La carga a la columna TMAE fue en 50 mm de tris pH 8,2. El diámetro de la columna era de 0,5cm y la altura de lecho era de 10 cm de altura del lecho (volumen-2.0 mL). La

columna fue expuesta a una carga de 500 mg/mL de resina, con una concentración de carga de 27,7 mg/mL.

[0123] La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de una solución que contenía 50mL de tris, NaCl al 2M, y un pH de 7,5 seguido por otra etapa de equilibrio que comprende una solución 50 mg de tris con pH al 8,2. La columna fue entonces cargada a 500 mg producto/ mL de resina con el pico de proteína neutralizado de la etapa previa y el producto fue recuperado en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de fracciones de lavado.

[0124] Estas condiciones de carga están en la región de partición débil. Los estudios de ligado de tanta fueron usados para medir el coeficiente de partición (K_p), y el ligado de producto A concentraciones de proteínas altas; en el pH 8,2, y aproximadamente con un contenido de cloro de 12mM, el coeficiente de partición K_p es estimado en 1,9 (de la interpolación del conjunto de datos de 1 selección HTS).

[0125] Los niveles de HCP y proteína A fueron medidos en tres fracciones durante la etapa de cargado representando exposiciones de carga de aproximadamente 250,375, y 500 mg/mL de resina. Los resultados del experimento 1.3 se presentan en la tabla 1.3.1. Estos resultados demuestran que los retos de producto muy altos pueden ser logrados en el modo de partición débil sin presentación de impurezas. La reducción

00076

de excelente tanto en HCP y proteína A fue lograda, junto con 50% de reducción en el contenido de HMW. En comparación con los resultados para la operación en el modo de flujo continuo en la tabla 1.2.1, la remoción de las impurezas fue mucho
5 mejor en el modo de partición débil.

Tabla 1.3.1: Remoción de HCP, proteína A y HMW para una exposición de carga de 500 mg/mL TMAE.

	Fracción temprana (250 mg/ml)	Fracción media (375 mg/ml)	Fracción tardía (500 mg/ml)	Grupo de producto final (ppm)
HCP residual ppm (ng/mg de producto)	<7,6	<7,6	<7,6	<7,6
Logaritmo del valor de remoción HCP (LRV)	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5
Proteína A residual ppm (ng/mg producto)	0.3	No determinado	0.1	0.6
Logaritmo del valor de remoción pro A (LRV)	2.9	No determinado	2.3	2.5
HMW	No determinado	No determinado	No determinado	Remoción de 2 veces

10

* Las impurezas en la carga fueron de 25,398ppm de HCP, 99,5ppm de proteína A, y 2,3% de HMW.

15

Experimento 1.4- serie de columna bajo condiciones de partición débil (estudios de robustez)

00155

[0126] Para confirmar adicionalmente el comportamiento de la columna TMAE en la región de partición débil, varias series fueron diseñadas variando el pH y la concentración de NaCl en la carga para la robustez del proceso de ensayo. Todas las series se llevaron a cabo con una exposición de carga de 250 mg/mL de resina. Varias series de Mabselect proteína A fueron llevadas acabo esencialmente como se describió en el experimento 1.2 para generar el material de carga para estas series. El único factor variado en estas series fue la concentración de cloruro de sodio en la elución de la proteína A que fue variada para casa con la concentración de NaCl en la carga TMAE para un experimento particular. Las columnas fueron equilibradas con amortiguadores de Equil 2 y lavadas con amortiguadores de lavado que tenia aproximadamente el mismo pH y el contenido de cloruro de sodio en la carga.

[0127] Estas condiciones de carga están en la región de partición débil. Los estudios de ligado por tandas fueron usados para medir el coeficiente de partición (KP). Las series se clasifican por los coeficientes de partición listados en la tabla 1.4.1. El producto ligado fue determinado mediante medir la proteína en la extracción de la columna usando absorbancia UV, y los rango entre 7,8 - 25,3 mg/mL. Los resultados de proteína A, HCP y HMW de estos experimentos también presentados en la tabla 1.4.1. La remoción de todas las impurezas se encontró que es robusta en

00156

los rangos operativos que cubre 13,5-38,8 mm de cloro total y pH 7,8-8,4.

5 **Tabla 1.4.1: Estudios de robustez del proceso en la remoción de HCP, proteína A, y HMW en el modo de partición débil.**

Concentración de NaCl (mM)	Kp	Producto ligado (mg/mL)	pH	HCP en la carga (ppm)	Proteína A En la carga (ppm)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (veces)	Recuperación (%)
38.8	0.26	9.4	7.8	26,391	493.5	3.7	1.8	2.0	92
13.5	0.41	7.9	7.8	12,821	69.2	3.3	>1.9	1.8	87
27.4	0.50	8	8.0	23,465	252	3.6	2.2	3.2	91
18.5	0.73	7.8	8.0	21,626	308	3.7	>3.2	2.9	90
23.5	0.80	9.5	8.1	18,004	343	3.2	>3.2	3.5	94
27.7	0.86	9.5	8.2	24,821	280	3.6	>3.2	2.6	99
18.5	1.48	10	8.2	17,669	252	3.7	>3.1	3.9	95
22.0	5.35	25.3	8.4	29,293	533	3.6	>2.9	2.3	90

Concentración NaCl (mM) Kp

10 **[0128]** De este estudio, puede verse que la remoción de
 proteína A (LRV) varía fuertemente con el Kp, mientras que el
 LRV del HCP es excelente en todos los valores de Kp en o por
 encima de 0,26, pero mucho más reducido en el Kp ed = 0,17
 (bajo condiciones de flujo continuos). La remoción de
 15 proteína en la célula anfitriona está sobre un logaritmo
 inferior para las condiciones de flujo continuo en
 comparación con las condiciones de partición débil, aun para
 una exposición de carga reducido. El producto ligado varía
 entre 7,8-25 mg/ml para estas condiciones de partición débil
 20 en la combinación de resina y anticuerpo monoclonal. El
 coeficiente de partición parece ser óptimo entre $0,41 < Kp < 5,4$.
 No aparece que sea igual en $Kp=0,17$ y un producto ligado de
 1,4-3,3 mg/ml, en las condiciones del experimento 1,2.

00137

Series 2-intercambio de anión usando TMAE-hicapM y Mab-IMA

Experimento 2.1-selección de alta presentación para
5 establecer las condiciones WP y FT.

[0129] Una selección de alta presentación (HTS) fue
llevada a cabo para identificar las condiciones de partición
débil y de flujo continuo para el medio Mab-IMA con TMAE-
10 hicap (M). Esta selección varía la concentración de cloruro
de sodio y del pH para determinar su efecto en el grado de
ligado del MAB-IMA y el proceso relacionado con las impurezas
(proteína A y HCP) con respecto al medio de MAE. 100 µl de
medio TMAE Hicap fue agregado a cada pozo de una placa de
15 filtro de 96 pozos. Cada pozo fue equilibrado en soluciones
hechas de hasta 25 mm de amortiguador y no más de 1 unidad de
pH retirada del Pk del amortiguador (tabla 2.1.1) y el nivel
apropiado de cloruro de sodio (tabla 2.1.2). El pH varió
entre 7,00 a 8,75 y la concentración de cloruro de sodio
20 vario entre 1 mm a 190mm.

[0130] Todos los amortiguadores fueron titulados para el
pH objetivo usando HCl al 12M. Como resultado de las
diferentes especies de amortiguación requirieron diferentes
25 niveles de titilación, la concentración de cloruro vario de
pozo en pozo dependiendo de que amortiguador fue usado para
ese pozo. La cantidad de Cl requerida para titular el
amortiguador con respecto al pH objetivo fue calculada usando

la adecuación Henderson-Hasselbach y se agrega al Cl total
contribuido del tanto NaCl como la cantidad en el material de
carga. El nivel de Cl calculado para cada pozo en el
experimento se da en la tabla 2.1.3.

5

Tabla 2.1.1: tipo de amortiguador y pH objetivo en cada pozo

	Todas las columnas
A	Etanolamina (pH = 8.75)
B	Tris (pH = 8.5)
C	Tris (pH = 8.25)
D	Tris (pH = 8.0)
E	Tris (pH = 7.75)
F	Tris (pH = 7.5)
G	Bis-Tris (pH = 7.25)
H	Bis-Tris (pH = 7.0)

Tabla 2.1.2: niveles de NaCl en cada pozo (en mm)

10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Todas las filas	1	5	10	15	25	35	50	75	100	125	150	190

Tabla 2.1.3: niveles de Cl. en cada pozo (en mm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	22	26	31	36	46	56	71	96	121	146	171	211
B	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
C	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200
D	15	19	24	29	39	49	64	89	114	139	164	204
E	18	22	27	32	42	52	67	92	117	142	167	207
F	21	25	30	35	45	55	70	95	120	145	170	210
G	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
H	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200

15

[0131] En la primera etapa del experimento HTS, cada peso fue equilibrado en las condiciones de Na Cl. y pH según se describió en las tablas 2.1.1 y 2.1.2 en una proporción de volumen de fase de 3:1 (300 μ L de solución: 100 μ L de resina).

5 La placa fue agitada durante 20 minutos, permitiendo que alcance el equilibrio. La solución fue entonces removida mediante centrifugar la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio fue repetido tres veces.

10 [0132] En la segunda etapa, la resina en cada pozo fue retada con una solución de Mab-IMA concentrada a 3 mg/ml de resina con una proporción de volumen de 3:1 (300 μ L de solución: 100 μ L de resina) con una concentración de NaCl y un pH apropiado. Una solución de 30 mg/ml de Mab-IMA en 1 mM
15 de Mes, 15 mM NaCl, pH 6,5 con 300ppm de proteína A fue usada como material de base. La placa cargada fue agitada durante 20 minutos, permitiendo que la resina y la solución se equilibre. El sobrenadante fue removido de la placa filtro mediante centrifugación y recolectado en una placa e
20 recolección. La concentración de proteína en el sobre nadante en cada pozo fue determinada mediante absorbancia en A280nm. Cualquier disminución en la proteína A y/o los niveles de HCP indica una condición que conduce a purificación.

25 [0133] En la tercera etapa, la resina fue lavada mediante agregar soluciones de NaCl especificado y de las condiciones de pH especificadas dadas en la tabla 2.1.2. El sobrenadante

00100

fue removido después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta etapa, NaCl al 2M se agrega para remover la proteína restante que estuviera ligada la resina. Los coeficientes de partición fueron calculados para cada pozo usando la masa eluida de las etapas 3 y 4 y la concentración de producto de la etapa 2, y se muestran en la tabla 2.1.4. Un gráfico del logaritmo del coeficiente de partición como una función del pH y del cloro se muestra en la figura 9.

10 **Tabla 2.1.4: Coeficientes de Partición (KP) Para las Selecciones de HTC 96 pozos para MAB-IMA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	34.5	20.2	11.4	7.2	3.5	1.8	0.8	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2
B	97.1	42.4	19.3	9.9	4.3	2.2	1.0	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2
C	14.8	9.4	5.8	4.2	2.0	1.1	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
D	1.8	1.6	1.3	1.0	0.7	0.5	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
E	0.7	0.7	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
F	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
G	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

15 **[0134]** Como se muestra en la tabla 2.1.4, el valor Kp puede ser usado para describir regiones en donde el MAB-IMA se liga al medio TMAE con diferentes fuerzas. Estas regiones son visualizadas más claramente en la figura 9. La fuerza con que el MAb-IMA se liga al medio TMAE puede ser manipulada
 20 mediante variar las condiciones de pH y concentración de cloro en el flujo continuo ($KP \leq 0.1$), partición de ($0.1 < KP < 20$), y zonas de ligado ($KP \geq 20$).

00131

[0135] El sobrenadante de la etapa de carga de los diversos pozos de cada zona fueron muestreados y sometidos con proteína A. La carga tenía 300ppm de proteína A. Los resultados del ensayo de estas muestras se resumen en la

5 tabla 2.1.5. Hay una región de pH y de conductividad en donde la etapa de cromatografía TMAE suministra una remoción muy

significante de proteína A con una pérdida de proteína limita con respecto a la resina. Esta región se encuentra que esta

correlacionada muy cercanamente con el valor del coeficiente

10 de partición, K_p , y no cualquier pH o concentración de cloro específicos.

Tabla 2.1.5 Niveles Residuales de Proteína A datos de ligado de MAb-IMA de las Selecciones HTS

15

pH	Cl- (mM)	K_p (predicho)	Proteína A (ppm)
8.5	12	42.4	<28 -BLOQ
8.5	32	4.3	<7 - BLOQ
8.25	35	2.0	<5 - BLOQ
8.25	45	1.13	<4 - BLOQ
8.0	39	0.7	<4 - BLOQ
8.25	60	0.5	<4 - BLOQ
7.75	42	0.4	<4 - BLOQ
7.5	45	0.3	35
8.0	64	0.3	63
8.25	110	0.3	190
7.25	32	0.2	90
8.0	89	0.2	177
8.75	121	0.3	217
7.75	92	0.2	187
7.5	120	0.2	219
7.25	107	0.2	224

Los valores K_p predichos son derivados de una respuesta de ajuste en superficie a las selecciones HTS, y la

00132

preedición subsiguiente del K_p con base en el modelo de regresión.

Experimento 2.2-series de columna bajo condiciones FT usando
5 TMAE-Hicap y mab-IMA.

[0136] El siguiente experimento fue llevado acabo en el modo de flujo continuo (FT) en donde el MAb-IMA interactúa solamente de manera muy débil con la columna. Cuatro series
10 fueron conducidas, con retos de producto de 109-275 mg/ml de resina.

Cromatografía de Intercambio de Anión Con TMAE (HiCap M)

15 [0137] Para todas las etapas de cromatografía de anión TMAE (HiCapM) escritas en el experimento de las series 2, las condiciones siguientes fueron usadas (se hacen excepciones anotadas en las descripciones experimentales individuales).

20 Índice de flujo racional-150-300cm/hr
Equilibrio 1-50 mm de tris, NaCl al 2,0m, pH 7.5 o 8,0
(5 volúmenes de columna)
Equilibrio 2-75 mm de NaCl, 50 mm de tris, pH 7,5 (las series 3 y 4 contenía 50 mm de glicina)
25 Lavado post cargado-75 mm de NaCl, 50 mm de tris, pH 7,5
(las series 3 y 4 contenían 50 mm de glicina)
Amortiguador de extracción-50 mm de tris, 2.0 M de NaCl, pH 7.5 de 8.0 (5 volúmenes de columna)

00123

[0138] Varias series de mab selecta de proteína A fueron llevadas a cabo esencialmente como se describió en el experimento 1.2 para generar el material de carga para estas series. Los grupos de anticuerpo purificado parcialmente de la etapa de proteína A descrita previamente fueron purificados adicionalmente en la etapa de intercambio de anión en 1 modo de flujo continuo (FT). Los diámetros de la columna variaron entre 1,0 a 3,2 cm y las alturas de la columna fueron 7,2 a 8,5 cm.

[0139] Las columnas fueron equilibradas con 5 volúmenes de columna de una solución que contiene 50 mm de tris 2M NaCl pH 7,5 seguido por otra etapa de equilibraron que comprende el 50 mm de tris, y pH 7,5 en solución. Las columnas fueron entonces cargadas entre 109 mg/ml y 275 mg/ml con el pico de proteína A parcialmente purificados y el producto fue recuperado en el influente de columna durante el ciclo de carga y durante algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado.

[0140] Estas condiciones de carga estaban en la región de flujo continuo (FT). La selección de alta exposición descrita en el experimento 2.1 suministra estimados para el valor del coeficiente de partición (KP) bajo estas condiciones de pH y de concentración de cloro. Las series se clasifican por los coeficientes de partición listados en la tabla 2.2.1. El producto ligado fue determinado mediante medir la proteína en

00101

la extracción de columna usando absorbancia UV. Este método para determinar la cantidad de producto ligado típicamente subestima la cantidad total del producto ligado debido a la elución isocrática del producto del lavado. Los resultados de remoción de proteína A, HCP, HMW Y LMW de estos experimentos también se presentan también en la tabla 2.2.1. Existe una remoción pobre y variable relativamente de HCP y ninguna remoción de proteína A y de variante de producto (especies HMW y LMW)

Tabla 2.2.1: Remoción de HCP, Proteína A y HMW y LMW en el Modo FT

Kp	producto ligado (mg/ml L)	pH	Cl- (mM)	Reto de carga (mg/mL)	ProA en la carga (ppm)	HCP en la carga (ppm)	HCP (LR V)	ProA (LRV)	HMW (veces)	LMW (veces)	(Recuperación) (%)
0.1	0.5	6.5	83	150	ND	4166	1.8	ND	1	1.1	>95%
0.2	0.8	7.0	83	275	25	1575	0.6	<0.1	1	1	>95%
0.2	ND	7.3	83	109	24	3117	2.4	<0.1	1	1	>95%
0.3	0.3	7.5	83	167	ND	4572	1.8	ND	1	1	>95%

ND = No determinado

Experimento 2.3-series de columna bajo condiciones de partición débil para Mab-IMA.

[0141] Los siguientes experimentos de columna fueron llevados a cabo en el modo de partición débil bajo las condiciones identificadas por la selección HTS (experimento 2.1). Siete series fueron llevadas acabo sobre la columna TMAE desde los grupos de proteína A parcialmente purificados.

00105

Cromatografía TMAE HiCap (M)

[0142] El anticuerpo parcialmente purificado de una serie
5 de etapa con Proteína A esencialmente igual que la descrita
previamente fue purificada adicionalmente en una etapa TMAE
bajo condiciones de partición débil (WP) de pH y contenido de
cloro como se describe más abajo. Los diámetros de la columna
variaron entre 0.5 a 3.2 cm y las alturas de la columna eran
10 de 9.4-9.5 cm.

[0143] Las columnas se equilibran con 5 volúmenes de
columna de una solución que contiene 50 mm de Tris, NaCl 2M,
pH 7.5 o 8.0 seguido por otra etapa de equilibrio que
15 comprende una solución de 50 mm de glicina, 50 mm de Tris, pH
7.5 u 8.0. Las columnas entonces se cargan hasta entre 124
mg/mL y 303 mg/mL con el pico de la Proteína A purificada
parcialmente y el producto se recupera en el efluente de
columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de
20 columna de la fracción de lavado. Los resultados de este
experimento se presentan en la Tabla 2.3.1.

[0144] Estas condiciones de carga están en las región de
partición débil (WP). La selección de alto rendimiento
25 descrita en el Experimento 2.1 suministra estimados para el
valor del coeficiente de partición (Kp). Las series se
clasifican por los coeficientes de partición listados en la
Tabla 2.3.1. El producto ligado se determina mediante medir

00166

la proteína en la extracción de columna usando absorbancia UV. Este método para determinar la cantidad de producto ligado típicamente subestima la cantidad total de producto ligado debido a la elución isocrática del producto en el lavado. Los resultados de Proteína A, HCP, HMW y LMW de estos experimentos también se presentan en la Tabla 2.2.1. Existe remoción de HCP consistente y alta, excelente remoción de Proteína A, y reducción valuable de variantes de producto (especies HMW y LMW).

10

[0145] Una comparación de los datos presentados en las Tablas 2.2.1 y 2.3.1 confirma que la remoción de HCP, de Proteína A, de HMW, y de LMW bajo condiciones de un modo de flujo continuo (Valores K_p de <0.3) es mucho menor que lo que se logra bajo condiciones de partición débil (valores de K_p >0.3), aún cuando la exposición de la carga exceda 300 mg/mL.

15

Tabla 2.3.1: Remoción de HCP, Proteína A, HMW, y LMW bajo condiciones de partición débil.

20

ND = no determinado

00107

Kp	Producto ligado (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	Exposición de Carga (mg/mL)	ProA En la carga (ppm)	HCP En la carga (ppm)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (veces)	LMW (veces)	Recuperación (%)
0.6	ND	7.5	14	303	72	754	1.9	1.6	1.3	1.5	>95%
0.7	ND	8.0	55	303	72	754	2.0	1.5	1.0	1.2	>95%
0.7	4	7.9	45	307	213	1852	2.6	2.4	ND	ND	>95%
1.0	5	8.1	45	302	222	1852	2.6	3.0	ND	ND	>95%
1.2	30	8.0	35	124	52	3320	2.8	>2.1	1.4	1.1	89%
1.7	ND	8.0	26	303	72	754	2.3	>2.6	1.1	1.8	>95%
1.7	9	8.1	31	310	ND	ND	ND	ND	ND	ND	90%
1.8	25	7.8	14	169	23	2462	3.0	>1.8	1.9	2.1	86%
5.2	9	8.0	17	303	72	754	2.0	>2.6	1.7	1.6	>95%
8.9	59	8.2	12	284	ND	ND	ND	ND	1.5	2.1	75%

Experimentos 2.4: Desempeño de las series en columna de partición débil en fabricación a escala Piloto y Clínica

5

[0146] La etapa del proceso TMAE para la purificación de Mab-IMA operada en la zona de partición débil fue escalada a la planta Piloto y a fabricación clínica. El cultivo que contienen el anticuerpo monoclonal se purifica primeramente utilizando una columna 3L o 5L MabSelect en el Piloto y una columna de 28 L MabSelect durante la fabricación clínica. La columna MabSelect se opera esencialmente como se describe en el Experimento 1.2. Los grupos de pico de Proteína neutralizados de estas series se purificaron adicionalmente sobre una columna de 1.5 L TMAE en Piloto y una columna de 7 L TMAE en las instalaciones de fabricación clínica. Los resultados de tres series piloto y nueve series de fabricación clínica se resumen en las Tablas 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente. El desempeño de la etapa fue consistente en todas las series, con excelente reducción de HCP, Proteína A, y buena remoción de productos relacionados con las especies

20

00103

HMW y LMW. La recuperación de producto fue >87% en todas las series. Un estimado del producto ligado a la resina durante las series Piloto fue obtenido del producto en la extracción de la columna, que estuvo en el rango de 6 - 14 mg/mL de resina.

Tabla 2.4.1: Desempeño de las series a Escala Piloto bajo condiciones de partición débil

	Kp	Exposición de Carga (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	Exposición de Carga (mg/mL)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (veces)	LMW (veces)	Recuperación (%)
Serie 1	1.7	14	8.1	31	253	3.4	>2.6	2.0	2.0	90
Serie 2	1.7	13	8.1	31	184	>3.6	>2.6	1.0	3.0	88
Serie 3	1.7	6	8.1	31	150	ND	>2.8	1.3	1.2	88

Tabla 2.4.2: Desempeño de las series a escala de fabricación bajo condiciones de partición débil

	Kp	Exposición de Carga (mg/mL)	Cl- (mM)	pH	HCP* (LRV)	ProA* (LRV)	HMW (veces)	LMW (veces)	Recuperación (%)
Serie 1	3.2	90	30	8.1	> 2.2	≥0.8	2.5	3.0	90
Serie 2	2.5	180	29	8.0	> 2.2	≥0.0	1.9	1.5	93
Serie 3	2.6	133	28	8.0	>2.3	≥1.0	2.5	1.8	95
Serie 4	2.6	174	29	8.0	>2.2	≥1.0	2.5	1.2	94
Serie 5	2.2	136	31	8.0	>2.0	≥0.9	2.3	1.7	102
Serie 6	3.8	146	27	8.1	> 2.2	≥0.8	2.5	1.8	91
Serie 7	2.0	118	28	7.9	> 2.2	≥1.0	1.6	1.6	96

* Los niveles de HCP y de Proteína A en el grupo pico TMAE estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

Resumen

00103

[0147] Las condiciones identificadas HTS para la operación WP y FT. El modo FT suministra solamente una reducción modesta en las especies HCP y LMW, y no hubo reducción en los residuos de Proteína A o en las especies HMW. La operación en el modo WP mejora la remoción de todas las impurezas sin sacrificar el rendimiento del producto. La etapa de proceso fue aumentada a una planta Piloto y operada consistentemente en tres series, con LRVs muy altos para HCP y Proteína A, y buenas reducciones en las especies HMW y LMW.

Series 3 - Intercambio de Anión utilizando TMAE-HiCapM y Mab-AAB

Experimento 3.1 - Selección de alto rendimiento para establecer condiciones WP y FT

[0148] El Experimento 3.1 fue llevado a cabo utilizando los procedimientos como se describió en el Experimento 1.1.

Experimento 3.2 - Series de capacidad de columna bajo condiciones que corresponden a coeficientes de partición variables

[0149] Cinco experimentos de cromatografía fueron llevados a cabo bajo condiciones que corresponden a un rango de coeficientes de partición identificados por la selección HTS (Experimento 3.1). Las columnas TMAE fueron cargadas hasta una selección de carga muy alto (>1000 g/L) para resaltar

00170

específicamente el desempeño superior de la etapa AEX bajo condiciones de partición débil.

[0150] Las siguientes condiciones fueron utilizadas para las series AEX llevadas a cabo en la Serie 3 (excepciones se anotan en las descripciones experimentales individuales).

Índice de flujo operacional- 150 - 300 cm/hr

Equilibrio 1 - 50 mm de Tris, NaCl 2.0 M, pH 7.5 (5 volúmenes de columna)

Equilibrio 2 -según se especificó, aproximadamente equivalente al pH de la carga y al contenido de cloro

Lavado postcarga - como se especificó, aproximadamente equivalente al pH de carga y al contenido de cloro

Amortiguador de extracción - 50 mm de Tris, NaCl 2.0 M, pH 7.5 (5 volúmenes de columna)

[0151] La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de columna de amortiguador de equilibrio 1 seguido por 5 volúmenes de columna de la etapa de equilibrio 2. La columna entonces se carga entre 940 y 2144 mg del producto/ml de resina con el grupo pico de Proteína A (referida a las Series 1, Experimento 1.1) ajustado al amortiguador de equilibrio apropiado 2.

25

[0152] Las fracciones efluentes de columna se recolectaron y se ensayaron posteriormente para los niveles de HCP y la Proteína A residual. Las condiciones de carga utilizadas en

00171

estos experimentos corresponden a coeficientes de partición progresivamente crecientes que abarcan las regiones de flujo continuo y partición débil (WP). La selección alta de productividad descrita en el Experimento 3.1 suministra

5 estimados para el valor del coeficiente de partición (K_p). Los valores del producto ligado en este ejemplo se calcularon con base en el producto eluido en la tira. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 3.2.1 y las Figuras 10A y 10B.

10

Tabla 3.2.1 - Resumen de los resultados de experimentos de exposición a carga muy alta en el modo de WP

	Coeficiente de Partición K_p	Condiciones de operación	Exposición de Carga mg/ml	Producto ligado mg/mL*	Recuperación*
Serie 1	0.1	Flujo continuo	1754	0	100
Serie 2	0.23	Particionado débil	940	14.2	98.5
Serie 3	0.8	Particionado débil	940	12.0	98.7
Serie 4	0.8	Particionado débil	2144	23.0	98.9
Serie 5	2.73	Particionado débil	960	12.6	98.7
Serie 6	7	Particionado débil	1130	71.7	93.7

* Con base los cálculos de balance de masa

15 [0153] El valor de ligado de producto para la tanda que corresponde a un K_p de 0.1 estuvo cerca de cero, como se esperaba para una operación de flujo continuo típica. Los valores del ligado de producto para los experimentos desarrollados en la región de partición débil fueron > 12.0

00172

mg/ml en todos los casos. De hecho, el valor del ligado de producto para la tanda que corresponde al Kp de 7 fue tan alto como 71 mg/ml. La recuperación del producto en el eluido de carga combinada y las fracciones de lavado en todos los
5 casos fueron, sin embargo, > 93%.

[0154] La remoción del HCP y la Proteína A, como una función de la exposición a la carga, se presenta en las Figuras 10A y 10B. Como se discutió anteriormente, la
10 remoción del HCP se incrementa significativamente en la medida en que las condiciones se mueven desde el flujo continuo a partición débil. La operación bajo condiciones de flujo continuo suministra aproximadamente 1.5 logs de la depuración de HCP, mientras que los valores de remoción del
15 log de HCP fueron tan altos como 3.8 logs a exposiciones de carga < 450 mg/ml de resina cuando se operaba a un Kp de 7 en la región de partición débil. A un Kp de 0.8 en la región de partición débil, se obtuvieron 2.8 logs de depuración de HCP para las exposiciones de carga de hasta 1000 mg/ml de la
20 resina, y se obtuvieron > 3 logs de depuración de HCP para hasta una exposición de carga de 800 mg/ml de resina a un Kp de 2.7 en la región de partición débil.

[0155] Como es el caso del HCP, la remoción de la Proteína A se incrementa significativamente en la medida en que
25 nosotros nos movemos de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de partición débil. Los resultados presentados en las Figuras 10A y 10B también resaltan el

00173

hecho de que incrementar el K_p de la operación desde la región de flujo continuo a la de partición débil incrementa tanto los valores HCP como los de depuración de log de Proteína A obtenidos antes del escape del contaminante, así como también la exposición de carga que corresponde al punto de escape. Un incremento adicional en K_p continúa el incremento en el HCP y la Proteína A LRV antes del escape del contaminante. Sin embargo, el punto de escape ocurre a exposiciones de carga relativamente más bajas en razón a que el producto ligado ahora compite con los contaminantes por los sitios de unión. Sin embargo, la capacidad de la columna para las tandas presentadas aquí fue muy alta aún para la tanda K_p alta.

15 **[0156]** En este ejemplo se muestra que la remoción de la Proteína A y HCP se puede mejorar significativamente mediante la operación de la etapa AEX bajo las condiciones de particionado débil y las exposiciones de carga en exceso de 1000 mg/ml de resina. Este ejemplo resalta una diferencia
20 fundamental entre la cromatografía de particionado débil y las operaciones estándar bajo las condiciones de unión. Las condiciones de particionado débil empujan los límites de la unión del producto solamente hasta un punto donde la depuración del contaminante se mejora significativamente,
25 mientras permanece alto el producto recuperado y las exposiciones de carga. Los valores K_p que corresponden a condiciones de unión son > 20 en AEX; bajo estas condiciones los efectos competitivos entre el producto y el contaminante

son tan fuertes que conducen a reducir la capacidad comparada con la cromatografía de particionado débil.

Series 4 - Interacción Hidrófoba utilizando Fenil Toyopearl y

5 Mab-AAB

Experimento 4.1 - Estudios de unión en tanda para establecer las condiciones WP y FT

10 [0157] Los estudios de unión en tanda se condujeron para identificar las condiciones de partición débil y de flujo continuo para Mab-AAB con medio de Fenil Toyopearl de Tosoh Biosciences. La sal que modula la resistencia de la interacción del producto con la resina es Na_2SO_4 , que varió de
15 0.20 a 0.90M. Las soluciones fueron amortiguadas para controlar a pH 7.5. Placas de filtro de 45 μm se utilizaron para incubar la resina con el líquido y para decantar el sobrenadante a través de centrifugación. Se hicieron ocho amortiguadores Tris/ Na_2SO_4 hecho con Na_2SO_4 a diferentes
20 concentraciones (0.2 M a 0.9 M). El Mab-AAB que fue parcialmente purificado mediante cromatografía de Proteína A se diluyó en una solución de Tris/ Na_2SO_4 hasta un final de concentración de 0.87 mg/ml. 50 μl de resina se equilibraron con 300 μl de amortiguador y luego el sobrenadante se decantó
25 para cada una de las condiciones Tris/ Na_2SO_4 ; este equilibrio se repitió tres veces. Después del equilibrio, la resina decantada se mezcló con el producto a la misma concentración de la sal y pH y se incubó durante 30 minutos con agitado

p0175

suave. La exposición de carga fue de 5.2 mg de producto/ml de resina para todas las condiciones. Una placa UV fue luego apilada al fondo de la placa de filtro para recolectar el sobrenadante luego de centrifugación. Posteriormente, 300 ul
5 de 50 mm de amortiguador Tris, pH 7.5 se aplicó a la resina para quitar el producto unido. Luego una incubación de 20 minutos, la tira se recolectó en una placa UV separada a través de centrifugación. La concentración del producto en cada fracción se midió mediante absorbancia UV y el
10 coeficiente de extinción para este MAb. Los cálculos se ajustaron para una conducción etapa por etapa sobre un volumen de 29 ul que se determinó a través de un conjunto separado de experimentos. El experimento se repitió cuatro veces bajo cada una de las condiciones de la sal y se reportó
15 un coeficiente de partición promedio.

[0158] La Tabla 4.2.1 resume los coeficientes de partición de este experimento. Las concentraciones más altas del Na_2SO_4 originaron una unión fuerte del producto, mientras que las
20 concentraciones de sal en el rango de 0.40 - 0.55M representan condiciones de partición débil.

Experimento 4.2 - Series de columna bajo partición débil, flujo continuo y condiciones de unión (estudios de alta
25 *exposición al producto)*

[0159] Las series de columnas se desarrollaron bajo flujo continuo, partición débil y condiciones de unión fuerte. Para

00176

todas las series de cromatografía de interacción hidrófoba con Fenil Toyopearl descritas en los experimentos de la Serie 4, se utilizaron las siguientes condiciones (se anotan las excepciones en las descripciones experimentales individuales)

5

Dimensión de la columna: diámetro 0.5 cm, altura del lecho 9.5 - 10.5 cm

Equilibrio - 50 mm Tris, pH 7.5 con $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ aproximadamente equivalente a la carga

Carga - $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ como se especificó adelante

Lavado - $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ igual a la carga (excepciones anotadas adelante)

Tira - 50 mm Tris, pH 7.5

[0160] Se utilizaron dos cargas diferentes: i) grupos de anticuerpo parcialmente purificados de una serie de la etapa de la Proteína A esencialmente la misma que aquellas
10 previamente descritas o ii) grupos de producto FF Q Sefarosa TMAE más puros del modo de operación FT.

Experimento 4.2.1 - Series de columna utilizando grupos de pico de Proteína A como carga

15

[0161] Los experimentos discutidos aquí se desarrollaron para resaltar el desempeño superior del HIC bajo condiciones de partición débil. Las series de columna se desarrollaron bajo concentraciones de sal variantes para cubrir un rango de
20 coeficientes de partición que corresponde al flujo continuo, la partición débil y las condiciones de unión fuertes. La selección de unión de tanta descrita en el Experimento 4.1 suministra los estimados para el valor del coeficiente de partición (K_p). Las columnas se equilibraron con los 5

00177

volúmenes de columna de una solución que contiene 50 mm de Tris, pH 7.5 y un $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ apropiado a una concentración específica. El pico de la Proteína A se concentró primero 10 veces, y posteriormente se diluyó a 14.77 mg/ml en la
5 concentración de sal apropiada. Los niveles de proteína de la célula anfitriona (HCP) y de Proteína A residuales en el material de carga fueron de 30911 ppm y 17.1 ppm, respectivamente. Todas las series de columna se desarrollaron a una exposición de carga de 100 mg/ml de resina. El producto
10 se recolectó en el efluente de columna durante la fracción del ciclo de carga. Después del flujo continuo de producto, los 10 volúmenes de columna de amortiguador de lavado a la misma concentración de sal como carga se aplicaron a la columna, seguido por cinco volúmenes de columna de un
15 amortiguador de tira que contiene 50 mm de Tris, pH 7.5. El contenido de HCP y de Proteína A en el eluido de carga y las muestras de lavado se analizaron posteriormente mediante ELISA. El nivel de impureza combinado tanto en el eluido de carga como en las fracciones de lavado se reportaron en la
20 Tabla 4.2.1.

[0162] Las series se califican mediante los coeficientes de partición. El producto ligado se determinó al medir la proteína en la tira de columna utilizando absorbancia UV.
25 Este método de determinar el producto ligado típicamente subestima la cantidad de producto ligado durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado.

00170

Tabla 4.2.1: Remoción de impurezas en condiciones de flujo continuo, partición débil y de unión fuerte

	Concentraci ón Na ₂ SO ₄	Coefficien te de Partición Kp	Ventana de operació n	Product o Ligado (mg/mL)	Recuperaci ón de Producto (%)	Remoció n de Proteín a A (doble)	Remoció n HCP (Log)
Seri e 1	0.10M	<0.1	Flujo continuo	0.6	94	0.9	0.3
Seri e 2	0.20M	<0.1	Flujo continuo	1.3	93	0.8	0.4
Seri e 3	0.40M	0.9	Partició n débil	2.8	94	1.7	1.0
Seri e 4	0.45M	2.0	Partició n débil	3.0	93	1.5	0.9
Seri e 5	0.50M	4.3	Partició n débil	3.8	92	2.5	N/A
Seri e 6	0.55M	9.9	Partició n débil	5.0	93	3.4	1.1
Seri e 7	0.80M	>100	Unión fuerte	25	72	2.2	0.7
Seri e 8	0.90M	>100	Unión fuerte	34	67	1.1	0.4

(El coeficiente de partición Kp cuenta para la proporción de volumen de fase de 6 de 50 microlitros de resina y 300 microlitros de solución).

5

[0163] Como es evidente de los datos presentados en la Tabla 4.2.1, el desempeño de la etapa de HIC mejora significativamente con respecto a la reducción del contaminante en la medida en que nosotros nos movemos desde las condiciones de flujo continuo a las de partición débil, mientras que la recuperación del producto es comparable. Un incremento adicional en la concentración de sal de operación conduce a coeficientes de partición que corresponden a las condiciones de ligado fuerte. Es una vez más claro de los datos presentados en la Tabla 4.2.1 que el desempeño de la etapa HIC se deteriora con respecto tanto a la reducción de contaminante, así como también a la recuperación del

00173

producto, en la medida en que nosotros nos movemos desde de las condiciones de partición débil a las de unión fuerte. La ventana de operación óptima para esta separación corresponde por lo tanto a aquella de la cromatografía de partición débil. Bajo las condiciones de partición débil, la etapa HIC suministra una reducción de 1 log de HCP y 3.4 veces la reducción de la Proteína A. Los niveles de producto ligado bajo las condiciones de partición débil, en este ejemplo, estuvieron entre 2.8 - 5 mg/ml de resina.

10

Experimento 4.2.2 - Series de columna utilizando grupos picos de Q Sefarosa como carga

[0164] Los grupos pico Q Sefarosa FF se utilizaron en estos conjuntos de experimentos para resaltar el hecho de que el desempeño de la etapa HIC bajo las condiciones óptimas de cromatografía de partición débil se puede mejorar adicionalmente con una fuente de alimentación más limpia. El material de carga en este caso contenía 2880 ppm de HCP y se generó al purificar el grupo pico de Proteína A sobre una columna Q Sefarosa FF. Dos experimentos, uno bajo condiciones de partición débil y el otro bajo condiciones típicas de flujo continuo, se condujeron para comparar el desempeño de la columna con respecto a la remoción de la impureza. El pico de Q Sefarosa se diluyó a 3.27 mg/ml a 550 mM de Na₂SO₄ y se cargó a la columna a una exposición de carga de 100 mg/ml de resina para la operación bajo condiciones de partición débil. La columna se lavó posteriormente con 10 CV de un

00120

amortiguador que contienen la misma concentración de sal que la carga y se peló con 6CV de 50 mm de amortiguador Tris, pH 7.5. El segundo experimento se condujo bajo condiciones de flujo continuo. La carga se ajustó a 3.03 mg/ml en 200 Na₂SO₄ y se cargó a la columna a una exposición de carga de 90 mg/ml de resina. La columna se lavó luego con 6CV de amortiguador que contiene la misma concentración de sal que la carga, y se peló posteriormente con 6 CV de 50 mm de amortiguador Tris, pH 7.5. En ambas series, el flujo continuo y las fracciones de lavado se recolectaron para la recuperación y análisis de la impureza. Los resultados de estas series se reportan en la Tabla 4.2.2.

Tabla 4.2.2: Comparación de los resultados de la partición débil HIC con los resultados del flujo continuo

Serie	Concentración Na ₂ SO ₄	Coeficiente de Partición (Kp)	Modo de operación	Exposición de Carga (mg/mL)	Producto Ligado (mg/mL)	Recuperación de Producto	HC PLRV
1	0.55M	9.9	Partición débil	100	3.0	94 %	>2
2	0.20M	<0.1	Flujo continuo	90	0.1	99 %	<0.5

[0165] Los valores de recuperación del producto bajo condiciones de partición débil fueron comparables con las operaciones de flujo continuo y también fueron independientes de la fuente de alimentación utilizada en estos experimentos.

00101

El desempeño de las etapas con respecto a la remoción de HCP es significativamente más alto bajo condiciones de partición débil comparadas con la operación de flujo continuo.

- 5 **[0166]** El HCP LRV a través de la etapa HIC con cualquier fuente de alimentación fue comparable bajo condiciones de flujo continuo (~ 0.4 - 0.5 LRV). Sin embargo, los valores HCP LRV para los experimentos desarrollados bajo condiciones de partición débil se incrementaron de 1 LRV con el material
- 10 de carga de Proteína A a más de 2 LRV con material de carga purificado a través de las columnas de Q Sefarosa FF.

Resumen

- 15 **[0167]** Otro modo de cromatografía (HIC) se mostró para operar exitosamente en el modo de partición débil. El desempeño de la etapa HIC bajo condiciones de partición débil se mostró por ser superior a ambas condiciones de flujo continuo, así como también a las operaciones bajo las
- 20 condiciones de unión más estrechas, con respecto a la recuperación del producto y a la remoción de HCP/Proteína A. Una capacidad de exposición a alta carga de 100 mg/ml de resina se procesó exitosamente bajo condiciones de partición débil, donde > 3 mg/mL del producto unido a la resina (aunque
- 25 la concentración de carga fue de 3.27 mg/mL). Los coeficientes de partición que corresponden a las condiciones óptimas de partición débil parecen ser ligeramente superiores que aquellas para la cromatografía de intercambio de anión.

00102

**Series 5 - Hidroxiapatita utilizando Hidroxiapatita de
cerámica Tipo I y Mab-MYA**

5 *Experimento 5.1 - Selección del rendimiento total alto para
establecer las condiciones WP y FT*

[0168] Una selección de rendimiento total alto (HTS) se
desarrolló para identificar las condiciones de partición
10 débil y de flujo continuo para Mab-MYA con medio de
hidroxiapatita de cerámica. Esta selección varió la
concentración de cloruro de sodio y fosfato de sodio para
determinar su efecto sobre la cantidad de unión de MAB-MYA al
medio de hidroxiapatita.

15

[0169] 50 µL de medio de hidroxiapatita de cerámica se
agregó a 30 pozos de una placa de filtro de 96 pozos. Cada
pozo se equilibró en soluciones hechas de concentraciones de
cloruro de sodio y de fosfato de sodio apropiadas en 100 mM
20 de amortiguador HEPES que contiene 100 mM de arginina a pH
7.2. Las concentraciones de las dos sales en la solución se
muestran en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2. Cada condición se
desarrolló en duplicado. La exposición de la carga de MAB-MYA
en cada uno de estos pozos fue de 5.0 mg/mL de resina

25

Tabla 5.1.1: Niveles de cloruro de sodio en cada pozo (en mM)

	1	2	3	4
--	---	---	---	---

A	50	200	50	200
B	750	50	750	50
C	50	380	50	380
D	500	760	500	760
E	50	1140	50	1140
F	200	200	200	200
G	350	200	350	200
H	700		700	

Tabla 5.1.2: Niveles de fosfato de sodio en cada pozo (en mM)

	1	2	3	4
A	5	20	5	20
B	5	30	5	30
C	8	30	8	30
D	8	30	8	30
E	10	30	10	30
F	10	50	10	50
G	10	100	10	100
H	10		10	

5 **[0170]** En la primera etapa de experimento HTS, cada pozo se equilibró en las condiciones de cloruro de sodio y fosfato de sodio como se describen en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2, en una proporción de volumen de fase de 6:1 (solución de 300uL: resina 50uL). La palca se agito durante 20 minutos,

10 permitiendo que se alcanzara el equilibrio. La solución se removió luego al centrifugar la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

[0171] En la segunda etapa, la resina en cada pozo se

15 expuso con una solución de MAb-MYA concentrada a la exposición de carga de proteína apropiada con una proporción de volumen de 6:1 (solución 300uL: resina 50uL) a la concentración de cloruro de sodio y de fosfato de sodio apropiadas. Una solución de 7.0 mg/mL de Mab-MYA en 50 mM de

00101

NaCl, 100 mm de HEPES, 100 mm de arginina, pH 7.2 se utilizó como solución madre. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, permitiéndole a la resina y a la solución equilibrarse. Se removi6 el sobrenadante de la placa de filtro mediante centrifugaci6n y se recolect6 en una placa de recolecci6n. La concentraci6n de la prote6na en el sobrenadante en cada pozo se determin6 mediante absorbancia a A280nm.

[0172] En la tercera etapa, se lav6 la resina al agregar soluciones de las condiciones de cloruro de sodio y fosfato de sodio especificadas listadas en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2. El sobrenadante se removi6 despu6s de agitar durante 20 minutos.

[0173] En la cuarta etapa, un amortiguador comprendido de 100 mm de fosfato de sodio, 1M de NaCl pH 7.2 se agreg6 para remover la prote6na restante que estaba ligada a la resina.

[0174] Los coeficientes de partici6n se calcularon para cada pozo utilizando la masa eluida de la etapa 4 y la concentraci6n del producto de la etapa 2, y se muestran en la Tabla 5.1.3.

Tabla 5.1.3: Coeficientes de Partici6n (Kp) para la selecci6n HTS de 96 pozos para MAB-MYO

	1	2	3	4
--	---	---	---	---

00105

A	49.3	2.3	50.5	2.4
B	3.5	6.0	4.1	6.0
C	31.6	0.4	34.7	0.3
D	2.9	0.1	3.3	0.1
E	28.1	0.0	28.3	0.0
F	7.2	0.5	7.7	0.4
G	3.5	0.0	3.1	0.0
H	1.1		1.1	

[0175] Como se muestra en la Tabla 5.1.3 el valor K_p se puede utilizar para describir regiones donde el MAB-MYA se liga al medio de hidroxiapatita con diferentes concentraciones. La concentración del MAB-MYA que se liga al medio de hidroxiapatita de cerámica se puede manipular al variar las condiciones de la concentración de cloruro y fosfato en el flujo continuo ($K_p \leq 0.1$), partición débil ($0.1 < K_p < 20$), y zonas de ligado ($K_p \geq 20$).

10

Experimento 5.2 - Series de columna bajo condiciones WP

[0176] Los experimentos discutidos aquí fueron desarrollados específicamente para resaltar el desempeño superior de la etapa cHA bajo condiciones de partición débil. Los experimentos se desarrollaron por lo tanto bajo condiciones que corresponden a un rango de coeficientes de partición identificados mediante la selección HTS (Experimento 5.1). Se condujeron doce series, con exposiciones de carga de producto de 100 mg/ml de resina.

20

Cromatografía de Proteína A Mabselect

00123

[0177] El cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal se purificó utilizando una columna MabSelect. La columna de Proteína A Mabselect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mm de Tris/150 mm de NaCl, pH 7.5 a una tasa de flujo de 300 cm/hr. La columna se cargó luego a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. Esta se siguió mediante un lavado de 10CV en 1M de arginina, 50 mm de Tris, pH 7.5 y un lavado 5CV que contiene 10 mm de Tris, 75 mm de NaCl, pH 7.5 de lavado. La columna se eluyó entonces utilizando 100 mm de arginina, 50 mm de NaCl, pH 3.0. El grupo de producto se neutralizó a un pH 7.2 utilizando 2M de HEPES pH 8.0.

Cromatografía de Hidroxiapatita de Cerámica

15

[0178] Los grupos de anticuerpo parcialmente purificados de la etapa de la Proteína A se purificaron adicionalmente sobre hidroxiapatita. El diámetro de la columna fue de 0.5 cm y la altura de la columna fue de 10 cm.

20

[0179] Para todas las etapas de cromatografía de hidroxiapatita descritas en las series del Experimento 5, se utilizaron las siguientes condiciones (las excepciones se anotan en las descripciones de los experimentos individuales).

25

Tasa de flujo Operacional - 150 - 240 cm/hr

00187

Equilibrio 1	300 mm de fosfato de sodio, 1.0M de NaCl, pH 6.8 (3 volúmenes de columna)
Equilibrio 2	5 - 30 mm de fosfato de sodio, 50 - 760 mm de NaCl, 100 mm de Arg, 100 mm de HEPES pH 7.2 (5 volúmenes de columna)
Lavado	5 - 30 mm de fosfato de sodio, 50 - 760 mm de NaCl, 100 mm de Arg, 100 mm de HEPES pH 7.2 (5 - 10 volúmenes de columna)

[0180] La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 seguido por otra etapa de equilibrio 2. La columna se cargó entonces a 100 mg de producto/ml de resina con el pico de la Proteína A de la etapa previa (ajustado al amortiguador de equilibrio 2 apropiado), y el producto se recuperó en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11.

[0181] Estas condiciones de carga estuvieron en el flujo continuo, en la partición débil (WP) y las regiones de ligado. La selección de rendimiento total alto descritas en el Experimento 5.1 suministra estimados para el valor del coeficiente de partición (K_p) y el producto de ligado (mg/mL de resina) bajo estas condiciones de concentración de cloruro y fosfato. El producto de ligado se determinó de los volúmenes de escape de producto de las series de columna. Los resultados de HCP y de Proteína A de estos experimentos se presentan en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11.

00100

Tabla 5.2.1: Remoción de HCP y Proteína A bajo flujo continuo, condiciones de partición débil y de ligado

	Coeficiente de Partición Kp	Modo de Operación	Phos	NaCl	Producto Ligado (mg/mL)	Recuperación de Producto (%)	Remoción de Proteína A (doble)	Proteína de Célula Anfitrión (LRV)
Serie 1	0.0	Flujo continuo	30	760	0	93	0	0.58
Serie 2	0.9	Partición débil	30	200	3.0	96	NA	0.57
Serie 3	1.1	Partición débil	10	700	3.2	94	1.7	0.9
Serie 4	1.7	Partición débil	20	200	3.1	94	NA	0.83
Serie 5	3.0	Partición débil	8	500	3.0	100	1.9	1.3
Serie 6	3.2	Partición débil	10	350	3.6	94	2.1	1.5
Serie 7	3.7	Partición débil	5	750	3.3	99	2.4	1.2
Serie 8	5.8	Partición débil	30	50	10.7	95	2.1	1.2
Serie 9	7.3	Partición débil	10	200	10.2	94	2.4	1.2
Serie 10	27.8	Unión fuerte	10	50	16.3	91	2.1	1.2
Serie 11	32.7	Unión fuerte	8	50	21.6	86	2.4	1.4
Serie 12	49.2	Unión fuerte	5	50	24.6	79	2.1	1.6

[0182] Es evidente de los datos presentados en la Tabla 5.2.1 y la Figura 11 que el desempeño de la etapa cHA mejora significativamente con respecto a la reducción de contaminante en la medida en que movemos de las condiciones de flujo continuo a las condiciones de partición débil, aunque es comparable la recuperación de producto. Bajo las condiciones de operación que corresponden a un incremento adicional en el coeficiente de partición (es decir, la operación en la región de ligado) no se suministra un beneficio adicional con respecto a la remoción del contaminante. Sin embargo, la recuperación del producto a través de la etapa comienza a caer bajo las condiciones de ligado fuerte. Así, la ventana operativa óptima para ésta

00000

separación corresponde a aquella de la cromatografía de partición débil. Bajo estas condiciones, la reducción $> 2 \log$ de Proteína A y la reducción $> 1.2 \log$ de la proteína de célula anfitriona se obtuvo a una exposición de carga de 100
5 mg de producto / ml de resina. Los niveles de producto ligado bajo las condiciones de partición débil, en este ejemplo, estuvieron entre 3.0-10.2 mg/mL de resina.

Resumen

10

[0183] Un tercer modo de cromatografía (hidroxiapatita) se mostró para operar exitosamente en el modo de partición débil. La Proteína A y el HCP se unen más estrechamente que el anticuerpo de producto a la resina de cerámica, y se
15 retienen fuertemente bajo condiciones WP. Los valores más altos de K_p en la región WP están entre 10 y 20 en algunos casos, aunque aún suministran buena recuperación de producto ($> 90\%$). Los niveles más bajos de K_p dan las recuperaciones correspondientemente más altas.

20

[0184] En este ejemplo se mostró que el desempeño de la etapa de columna se puede optimizar principalmente a través de la escogencia del coeficiente de partición utilizado para correr la columna. El coeficiente de partición en
25 hidroxiapatita es una función compleja del pH, sal (tipo y concentración), fosfato, y componentes de amortiguador. Todas estas variables en general tienen un impacto en el desempeño de la etapa de columna. La aproximación presentada aquí

00000

suministra unos medios simples de relacionar el impacto de cambiar una cualquiera de estas variables sobre el desempeño de columna. La aproximación del "coeficiente de partición" unificado presentada en este ejemplo abre la posibilidad de
5 operar en un espacio operativo más amplio en este modo de cromatografía que lo que se ha hecho antes. Las condiciones de partición débil para el desempeño óptimo se pueden identificar fácilmente utilizando los métodos HTS descritos anteriormente.

10

Series 6 - Hidroxiapatita que utiliza Hidroxiapatita de cerámica Tipo I y Mab-A5T

*Experimento 6.1 - Selección de rendimiento total alto para
15 establecer las condiciones WP y FT*

[0185] Una selección de rendimiento total alto (HTS) se desarrolló para identificar las condiciones de partición débil y de flujo continuo para Mab-A5T con medio de
20 hidroxiapatita cerámica. Esta selección varió del pH, las concentraciones del cloruro de sodio y del fosfato de sodio para determinar su efecto sobre la proporción del ligado de MAB-A5T al medio de hidroxiapatita.

25 [0186] 50µL de medio de hidroxiapatita cerámica se agregaron a 36 pozos de una placa de filtro de 96 pozos. Cada pozo se equilibró en soluciones hechas de las concentraciones de cloruro de sodio y fosfato de sodio apropiadas en 50 mM de

00191

amortiguador HEPES que contiene 50 mM de arginina a un pH 7.0 o pH 8.0. Las concentraciones de las dos sales en la solución se muestran en las Tablas 6.1.1 y 6.1.2. Las condiciones mostradas en las columnas 1-3 se desarrollaron a un pH 7.0, y
5 las columnas 4-6 se desarrollaron a un pH 8.0. La exposición a la carga de MAB-A5T en cada uno de estos pozos fue de 5.0 mg/mL de resina.

Tabla 6.1.1: Niveles de cloruro de sodio en cada pozo (en mM)

10

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	50	400	400	50	400	400
B	50	50	400	50	50	400
C	50	50		50	50	
D	100	50		100	50	
E	100	100		100	100	
F	100	100		100	100	
G	400	100		400	100	
H	400	400		400	400	

Tabla 6.1.2: Niveles de fosfato de sodio en cada pozo (en mM)

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	2	32	8	2	32	8
B	8	2	32	8	2	32
C	32	8		32	8	
D	2	32		2	32	
E	8	2		8	2	
F	32	8		32	8	
G	2	32		2	32	
H	8	2		8	2	

15 **[0187]** En la primera etapa del experimento HTS, cada pozo se equilibró en las condiciones de cloruro de sodio, fosfato de sodio y pH como se describió en la Tabla 6.1.1 y 6.1.2 en

00102

la proporción de volumen de fase de 6:1 (solución 300uL: resina 50uL). La placa se agitó durante 20 minutos, permitiendo que se alcanzara el equilibrio. La solución se removi6 entonces al centrifugar la placa del filtro. Este
5 ciclo de equilibrio se repiti6 tres veces.

[0188] En la segunda etapa, la resina en cada pozo se expuso con una soluci6n de MAb-A5T concentrada a la exposici6n de carga de prote6na apropiada con una proporción
10 de volumen de 6:1 (soluci6n 300uL: resina 50uL) al pH y la concentraci6n de cloruro de sodio y fosfato apropiados. Una soluci6n de 6.9 mg/mL de Mab-A5T en 1 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, pH 7.0 se utiliz6 como soluci6n madre. La placa cargada se agit6 durante 20 minutos, permitiéndole a la resina y a la
15 soluci6n equilibrarse. El sobrenadante se removi6 de la placa de filtro mediante centrifugaci6n y se recolect6 en una placa de recolecci6n. La concentraci6n de prote6na en el sobrenadante en cada pozo se determin6 mediante absorbancia a A280nm.

20

[0189] En la tercera etapa, la resina se lav6 al agregar soluciones de las condiciones de cloruro de sodio, fosfato de sodio y pH especificadas, listadas en las Tablas 6.1.1 y 6.1.2. El sobrenadante se removi6 despu6s de agitar durante
25 20 minutos.

[0190] En la cuarta etapa, un amortiguador que comprende 100 mM de fosfato de sodio, 1M de NaCl pH 7.2 se agreg6 para

00193

remover la proteína restante que se ligó a la resina. Los coeficientes de partición se calcularon para cada pozo utilizando el eluido de masa proveniente de la etapa 4 y la concentración de producto proveniente de la etapa 2, y se

5 muestran en la Tabla 6.1.3.

Tabla 6.1.3: Coeficientes de partición (Kp) para la selección HTS para MAB-A5T

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	142.7	0.1	1.6	50.2	0.0	0.3
B	90.6	144.3	0.1	9.9	44.7	0.0
C	12.1	84.5		1.0	13.7	
D	90.5	10.4		22.2	1.1	
E	27.5	94.1		4.3	21.9	
F	2.5	28.0		0.3	4.3	
G	15.1	2.1		2.2	0.4	
H	1.2	15.1		0.4	2.0	

10

[0191] Como se muestra en la Tabla 6.1.3, el valor Kp se puede utilizar para identificar las regiones donde el MAB-A5T se une al medio de hidroxiapatita con diferentes concentraciones. La concentración del MAB-A5T que se une al

15 medio de hidroxiapatita cerámica se puede manipular al variar las condiciones de NaCl, fosfato y pH en unas zonas de flujo continuo, partición débil, y ligado.

Experimento 6.2 - Series de columna bajo condiciones WP

20

[0192] Los experimentos se desarrollaron para resaltar el desempeño superior de la etapa CHA bajo condiciones de

00102

partición débil. Los experimentos se desarrollaron por lo tanto bajo condiciones que corresponden al rango de los coeficientes de partición identificados mediante la selección HTS (Experimento 6.1). Se condujeron ocho series, con 5 exposiciones de carga de producto de 110 mg/ml de resina.

Cromatografía de Proteína A Mabselect

[0193] El cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal se purificó utilizando una columna MabSelect. La columna de Proteína A Mabselect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mm de Tris/150 mm de NaCl, pH 7.5 a una tasa de flujo de 300 cm/hr. La columna se cargó entonces a una exposición de carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. Esta se siguió por un lavado de 5CV en 1M de arginina, 50 mm de Tris, pH 7.5 y un lavado 5CV que contiene 10 mm de Tris, 75 mm de NaCl, pH 7.5 de lavado. La columna se eluyó entonces utilizando 100 mm de arginina, 50 mm de NaCl, pH 3.0. El grupo de producto se neutralizó a un pH 7.2 utilizando 2M de HEPES pH 8.0.

Cromatografía de Hidroxiapatita Cerámica

[0194] Los grupos de anticuerpo parcialmente purificados provenientes de la etapa de la Proteína A se purificaron adicionalmente sobre hidroxiapatita. El diámetro de la columna fue de 0.5 cm y la altura de la columna fue de 10 cm.

00105

Para todas las etapas de cromatografía de hidroxiapatita descritas en las series del Experimento 6, se utilizaron las siguientes condiciones (las excepciones se anotan en las descripciones del experimento individual).

5

Tasa de flujo Operacional - 150 - 240 cm/hr
 Equilibrio 1 300 mm de fosfato de sodio, 1.0M de NaCl, pH 6.8 (3 volúmenes de columna)
 Equilibrio 2 2 - 32 mm de fosfato de sodio, 50 - 400 mm de NaCl, 5 mm de Imidazol, 50 mm de glicina, 10 mm de HEPES, pH 7.0 (5 volúmenes de columna)
 Lavado El mismo que el equilibrio 2.

[0195] La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del amortiguador de equilibrio 1 seguido por otra etapa de
 10 equilibrio 2. La columna se cargó luego a 110 mg de producto/ml de resina con el pico de la Proteína A de la etapa previa (ajustado al amortiguador de equilibrio 2 apropiado), y el producto se recuperó en el efluente de
 15 columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 6.2.1 y la Figura 12.

Tabla 6.2.1: Coeficientes de partición para MAB-A5T sobre la resina cHA y la correspondiente ventana de operación

20

	Coeficiente de Partición Kp	Ligado de Producto mg/ml	Modo de Operación	Phos mM	NaCl mM	pH
Serie 1	0.1	0	Flujo continuo	32	400	7.0
Serie	0.7	1.6	Partición	32	170	7.0

00106

2			débil			
Serie 3	1.4	2.2	Partición débil	32	120	7.0
Serie 4	2.1	1.6	Partición débil	2	400	7.0
Serie 5	13.7	7.0	Partición débil	8	50	8.0
Serie 6	22	6.7	Partición débil	2	100	8.0
Serie 7	54	12.8	Ligado fuerte	2	60	8.0
Serie 8	>100	16	Ligado fuerte	2	50	7.0

[0196] Las condiciones de operación en estos experimentos corresponden al flujo continuo, la región de partición débil (WP) y las regiones de ligado. El experimento HTS descrito en el Experimento 6.1 suministra estimados para el valor del coeficiente de partición (K_p) bajo estas condiciones de pH, concentraciones de cloruro y fosfato. Las series en la Tabla 6.2.1 están calificadas por los coeficientes de partición. El producto ligado se determinó al medir la proteína en la tira de columna utilizando absorbancia UV. Este método de determinar el producto ligado típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado. El HCP y la remoción de HMW relacionada con el producto, así como también los resultados de recuperación del producto se presentan en la Figura 12.

[0197] Es claro de los datos presentados en la Figura 12 que el desempeño de la etapa cHA mejora significativamente con respecto a la reducción HCP y HMW en la medida en que movemos de las condiciones de flujo continuo a las

condiciones de partición débil, mientras que la recuperación del producto se mantiene a $> 80\%$. Operando bajo condiciones que corresponden a un incremento adicional en el coeficiente de partición (es decir, la operación en la región de unión),
5 no se suministra un beneficio adicional con respecto a la remoción del contaminante. Sin embargo, la recuperación del producto a través de la etapa comienza a caer bajo las condiciones de ligado fuerte. Así, la ventana de operación óptima para esta separación corresponde a aquella de la
10 cromatografía de partición débil. Bajo estas condiciones, una reducción de cuatro veces de las especies HMW relacionadas con el producto y una reducción > 1.4 log de HCP se obtuvo a una exposición de carga de 110 mg del producto/ml de resina. Los niveles del producto ligado bajo condiciones de partición
15 débil, en este ejemplo, estuvieron entre 1.6-6.7 mg/ml de la resina.

[0198] Se presenta un segundo ejemplo en hidroxapatita donde operando bajo cromatografía de partición débil se
20 mostró para suministrar desempeño mejorado con respecto a la reducción de HCP y HMW y la recuperación de producto ($> 80\%$). Como en los ejemplos previos, el desempeño de la etapa se optimizó principalmente a través de la elección de los coeficientes de partición utilizados para correr la columna.
25 La aproximación presentada aquí suministra unos medios simples de relacionar el impacto de cambiar una cualquiera de las varias variables (pH, sal, fosfato, imidazol, glicina, HEPES, etc.,) al desempeño de la columna. Las condiciones de

00000

partición débil para el desempeño óptimo se pueden fácilmente identificar utilizando los métodos HTS descritos en este ejemplo. La aproximación presentada aquí abre la posibilidad de operar en un espacio operativo más amplio en este modo de cromatografía de lo que se había hecho antes. La región WP óptima en este ejemplo corresponde a los coeficientes de partición entre 2 y 20.

Serie 7 - Hidroxiapatita utilizando Hidroxiapatita de Cerámica Tipo I y Mab-MYO

Experimento 7.1 - Selección de rendimiento total alto para establecer FT, WP y las condiciones de ligado fuerte

[0199] Una selección de rendimiento total alto (HTS) se desarrolló para identificar las condiciones de flujo continuo, partición débil y de ligado para Mab-MYO con medio de hidroxiapatita de cerámica. Esta selección varió la concentración de pH, arginina/glicina, HEPES, fosfato de sodio y cloruro de sodio para determinar su efecto sobre la proporción de ligado de MAB-MYO al medio de hidroxiapatita.

[0200] Los procedimientos HTS utilizados en este ejemplo fueron similares a aquellos descritos en las Series 5 y las Series 6 y no se discuten aquí. Los valores Kp predichos derivados de un ajuste de superficie de respuesta a los datos HTS fueron utilizados para escoger las condiciones específicas para los experimentos de columna.

00100

Experimento 7.2 - Series de columna bajo condiciones WP

[0201] Los experimentos discutidos aquí se desarrollan bajo
5 condiciones que corresponden al rango de coeficientes de
partición identificados mediante los experimentos HTS. Estos
experimentos se desarrollaron específicamente para resaltar
el desempeño superior de la etapa CHA bajo condiciones de
partición débil para la remoción del HCP y las especies HMW
10 relacionadas con el producto. Cuatro series se condujeron con
una exposición de carga de producto de 55 mg/ml de resina. La
exposición de carga utilizada en estos experimentos es baja
para cromatografía de partición débil, pero es típica para
operación de flujo continuo. No se ha hecho ningún intento en
15 estos experimentos para optimizar la exposición de carga para
la cromatografía de partición débil.

[0202] Los grupos de Anticuerpo parcialmente purificados
provenientes de la etapa de Proteína A se utilizaron en estos
20 experimentos. El diámetro de la columna fue de 0.5 cm y la
altura de la columna fue 10 cm.

[0203] Para todas las etapas de cromatografía de
hidroxiapatita descritas en las series del Experimento 7,
25 fueron utilizadas las siguientes condiciones (excepciones se
anotan en las descripciones del experimento individual).

Índice de flujo operacional - 150 -240 cm/hr

80000

Equilibrio 1 300 mm de fosfato de sodio, 1.0 M NaCl,
pH 6.8 (2-5) volumen de columna)

Equilibrio 2 1-8 mm de fosfato de sodio, 50 -1750 mm
5 NaCl, 12 - 50 mm de Arg, 20-50 mm HEPES
pH 7.0 (5 volúmenes de columna)

Lavado El mismo que el Equilibrio 2

10 [0204] La columna se equilibrio con 2-5 volúmenes de
columna de amortiguador equilibrado 1 seguido por 5 volúmenes
de columna de equilibrio 2. La columna fue luego cargada a 55
mg de producto/ml de resina con un pico de proteína A
(ajustado al amortiguador 2 de equilibrio apropiado), y el
15 producto se recuperó en el efluente de columna durante el
ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción
de lavado. Los resultados de este experimento se presentan en
la Tabla 7.2.1 de la Figura 13.

20 **Tabla 7.2.1: Coeficientes de partición para MAB-MYO y la
resina cHA y el correspondiente modo operativo.**

	Coeficiente de partición Kp	Modo de operación	Arg mM	Hepes mM	Phos mM	NaCl mM	Ligado de producto mg/ml
Serie 1	3.6	Partición débil	50	20	8	300	5.1
Serie 2	4.2	Partición débil	50	20	2	600	8.2
Serie 3	8.9*	Partición débil	12	20	1	1750	9.5
Serie	>100	Ligado	50	50	5	50	41.6

00201

4		fuerte					
---	--	--------	--	--	--	--	--

*La condición Kp óptima, Ver Figura 13

[0205] Las condiciones de operación en estos experimentos corresponden al flujo continuo, partición débil (WP) y las regiones de ligado. El experimento HTS descrito en el experimento 7.1 suministra los estimados para el valor del coeficiente de partición (Kp) bajo estas condiciones de pH, cloruro, fosfato, glicina/arginina y concentración HEPES. Las series en la Tabla 7.2.1. Están calificadas por los coeficientes de partición. El producto ligado se determinó al medir la proteína en la tira de columna utilizando absorbancia UV. Este método de determinar el producto ligado típicamente subestima la cantidad de producto ligado durante la carga debido a la desorción gradual del producto durante el lavado. La remoción del peso molecular alto relacionado con el producto (HMW) y la recuperación del producto resultados de estos experimentos también se presentan en la Figura 13.

Es evidente de los datos presentados en La Figura 13 que el desempeño de la etapa cHA mejora significativamente con respecto a la reducción HMW en la medida en que nos movemos de desde las condiciones de flujo continuo a las condiciones de partición débil, ventas de productos mientras que la recuperación del producto es > 80%. Operando bajo condiciones que corresponden a un incremento adicional en el coeficiente de partición (es decir operando en la región de ligado) no se

00202

suministra un beneficio adicional con respecto a la remoción contaminante.

Sin embargo, la recuperación del producto a través de la
5 etapa inicia cayendo bajo las condiciones de ligado fuerte. Así, la ventana de operación óptima para esta separación corresponde a aquella de la cromatografía de partición débil. Bajo estas condiciones, se obtuvo una reducción de 20 veces de las especies HMW relacionadas con el producto. Los niveles
10 de producto ligado bajo las condiciones de partición del, de este ejemplo estuvieron entre 5.1 -9.5 mg/ml de resina

Resumen

15 [0206] Un segundo ejemplo se presentó en hidroxapatita donde operando bajo cromatografía de partición débil se mostró suministrar desempeño mejorado con respecto a la reducción HMW con buena recuperación de producto (> 80%). Las especies HMW relacionadas con el producto las especies HMW se
20 unen más estrechamente la resina cerámica que el anticuerpo de producto, y es retenido más fuertemente bajo condiciones de WP. La región WP en este ejemplo corresponde a los coeficientes de partición entre 8 y 20.

25 [0207] Se mostró una vez de nuevo que el desempeño en la etapa de columna se puede optimizar principalmente a través de la elección de los coeficientes de partición utilizados para correr la columna. La aproximación presentada aquí

00003

suministra unos medios simples de relacionar el impacto de cambiar una cualquiera de las varias variables (pH, sal, fosfato, arginina, HEPES etc.) al desempeño de la columna. Las condiciones de partición débil para el desempeño óptimo se pueden identificar fácilmente utilizando los métodos HEPES descritos en este ejemplo. La aproximación presentada aquí abre la posibilidad de operar en un espacio operativo más amplio en este modo de cromatografía de lo que se ha hecho antes.

10 [0208] También es provechoso notar aquí que el concepto de cromatografía de partición débil también trabaja en sistemas que no son manejados mediante las interacciones de carga sola. La aproximación general descrita en esta solicitud puede ser exitosamente aplicada a sistemas complejos tales como HIC e hidroxipatita, Por ejemplo, además del pH operativo, otras varias variables tales como NaCl, sales de fosfato, arginina/glicina, especies de amortiguador, así como también el tipo de resina todas pueden impactar en el desempeño de la etapa de la hidroxipatita. Sin embargo, uno podría identificar fácilmente la ventana WP al desarrollar experimentos de ligado de tabla 5 con el producto de interés o no.

25 Series 8-amortiguador Zwitteriónico para elución de Proteína A y las subsecuentes etapas de intercambio de ion.

0029:

[0209] Un cultivo que contiene un anticuerpo monoclonal se purificó utilizando una resina MabSelect. La columna de proteína A Mabselect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mm de Tris/150 mm NaCl, pH 7.5. La columna fue luego
5 cargada a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. Esta siguió por 5 CV de lavado en 1M de NaCl, 50 mm de Tris, pH 7.5 y 5 CV de lavado que contiene 10 mm de Tris, 75 mm NaCl, y pH 7.5 de lavado. La columna luego se diluyó utilizando 30 mm de HEPES, pH 3.1. El grupo de
10 producto se neutralizó a pH 7.2 utilizando 1M de HEPES pH 8.0, dando como resultado una concentración de HEPES total de 55 mm. At pH 7.2, el HEPES contribuye con 17 mm de concentración iónica al amortiguador.

15 [0210] Todas las referencias citadas aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos en la misma proporción como si cada publicación individual o patente o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como
20 referencia en su totalidad para todos los propósitos. En la proporción en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente incorporadas como referencia contradigan la descripción contenida en la especificación, la especificación pretende prevalecer y/o tomar precedencia sobre cualquier
25 material contradictorio.

[0211] Todos los números que expresen cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y así sucesivamente

00005

utilizados en las especificaciones y reivindicaciones se deben entender por ser modificados en todos los casos por el término "aproximado". De acuerdo con esto, a menos 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 buscadas para ser obtenidas con la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debe considerar a la luz del número de dígitos significativos y aproximaciones redondeadas ordinarias.

[0212] Muchas modificaciones y variaciones de la invención se pueden hacer sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para aquellos expertos en la técnica. Las modalidades descritas aquí se ofrecen por vía de ejemplo solamente y no pretenden limitar de ninguna manera. Se pretende que la especificación y ejemplos son considerados como solamente ejemplos, con un alcance y espíritu real de la invención siendo indicado en las siguientes reivindicaciones.

00203

REIVINDICACIONES

1. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

5 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de producto por mL de medio; y recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

2. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

15 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1; y recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

3. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

25 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una de al menos 1 a aproximadamente 70 mg de producto

00297

por mL de medio y definido por un coeficiente de
partición de 0.3 a 20; y

recuperar el producto purificado en el efluente de la
columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
5 esencialmente isocrático.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
en donde las condiciones de operación se identifican en
una etapa de selección.

10

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
en donde las condiciones de operación comprenden fuerzas
iónicas y niveles de pH.

15 6. El método de la reivindicación 5, en donde las
condiciones de operación comprenden adicionalmente
concentraciones de sal.

7. El método de la reivindicación 5, en donde las
20 condiciones de operación comprenden adicionalmente
concentraciones de excipiente.

8. El método de la reivindicación 7, en donde las
condiciones de operación comprenden adicionalmente
25 concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio,
concentraciones de arginina, concentraciones de glicina,
y concentraciones HEPES.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH y niveles de contraligando.

5 10. El método de la reivindicación 9, en donde las condiciones de operación comprenden adicionalmente concentraciones de imidazol.

11. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa de
10 selección utiliza estudios de unión de tanda.

12. El método de la reivindicación 4, en donde la etapa de selección utiliza estudios de unión de columna.

15 13. El método de la reivindicación 12, en donde los estudios de unión de columna son estudios de elución de gradiente.

14. El método de la reivindicación 12, en donde los estudios
20 de unión de columna son estudios de elución isocráticos

15. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 5 mg de producto por mL de medio.

25

16. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 10 mg de producto por mL de medio.

00000

17. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 20 mg de producto por mL de medio.

5

18. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 30 mg de producto por mL de medio.

10 19. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 40 mg de producto por mL de medio.

15 20. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 50 mg de producto por mL de medio.

20 21. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de operación originan que el medio se una a al menos 60 mg de producto por mL de medio.

22. El método de la reivindicación 2, en donde el valor del coeficiente de partición está en el rango de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 20.0.

25

23. El método de la reivindicación 2, en donde el valor del coeficiente de partición está en el rango de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 10.0.

00210

24. El método de la reivindicación 2, en donde el valor del coeficiente de partición está en el rango de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 5.0.

5

25. El método de la reivindicación 2, en donde el valor del coeficiente de partición está en el rango de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5.0.

10 26. El método de la reivindicación 2, en donde el valor del coeficiente de partición está en el rango de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1.5.

15 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el producto es una proteína seleccionada del grupo que consiste de proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugadas, citocinas, interleucinas, hormonas, y enzimas terapéuticas.

20 28. El método de la reivindicación 23, en donde la proteína que contiene Fc es un anticuerpo.

25 29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el medio es un medio de intercambio de ión cargado.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el medio de intercambio de ión cargado es una resina de intercambio de anión.

5 31. El método de la reivindicación 29, en donde el medio de intercambio de ión cargado es una resina de intercambio de catión.

10 32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el medio es una resina de cromatografía de interacción hidrófoba.

33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el medio es una resina hidroxiapatita.

15

34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el medio es una resina de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada.

20 35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde una o más impurezas se seleccionan del grupo que consiste de proteínas de célula anfitriona, ácidos nucleicos, variantes de productos, endotoxinas, y Proteína A.

25

36. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden adicionalmente virus.

Page 2

37. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden proteínas de célula anfitriona con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 100 ng de proteínas de célula anfitriona por mg de producto.

38. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden proteínas de célula anfitriona con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 250 ng de proteínas de célula anfitriona por mg de producto.

39. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden proteínas de célula anfitriona con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 500 ng de proteínas de célula anfitriona por mg de producto.

40. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden Proteína A con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 100 ng Proteína A por mg de producto.

41. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden Proteína A con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 50 ng Proteína A por mg de producto.

42. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden Proteína A con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 10 ng Proteína A por mg de producto.

5

43. El método de la reivindicación 35, en donde las impurezas comprenden ácidos nucleicos con una concentración en el producto purificado de no más de aproximadamente 1 ng ácidos nucleicos por mg de producto.

10

44. El método de la reivindicación 35, en donde la concentración de variantes de productos en el producto purificado es no más de aproximadamente 0.5%.

15

45. El método de la reivindicación 35, en donde la concentración de variantes de productos en el producto purificado es no más de aproximadamente 2%.

20

46. El método de la reivindicación 35, en donde la concentración de variantes de productos en el producto purificado es no más de aproximadamente 5%.

25

47. El método de la reivindicación 35, en donde la concentración de variantes de productos en el producto purificado es no más de aproximadamente 10%.

00215

48. El método de la reivindicación 36, en donde el valor log de remoción del virus es mayor de 1.0.
49. El método de la reivindicación 36, en donde el valor log
5 de remoción del virus es mayor de 2.0.
50. El método de la reivindicación 36, en donde el valor log de remoción del virus es mayor de 3.0.
- 10 51. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de las proteínas de célula anfitriona es al menos 1.0.
- 15 52. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de las proteínas de célula anfitriona es al menos 2.0.
- 20 53. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de las proteínas de célula anfitriona es al menos 3.0.
54. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de la Proteína A es al menos 1.0.
- 25 55. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de la Proteína A es al menos 2.0.

00215

56. El método de la reivindicación 35, en donde el valor log de remoción de la Proteína A es al menos 3.0.
57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
5 en donde un fluido que contiene producto se eluye de una columna de Proteína A utilizando un amortiguador de elución de baja fuerza iónica; el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajusta utilizando un amortiguador de neutralización que resulta en no más de
10 20 mm de la fuerza iónica del fluido que contiene producto, resultando en el fluido de carga; y en donde tal fluido de carga se pasa a través de un medio de intercambio de ión.
- 15 58. El método de la reivindicación 57, en donde el fluido de carga se pasa a través de un medio de intercambio de anión sin la necesidad de diafiltración.
59. El método de la reivindicación 57, en donde el pH y la
20 conductividad del fluido que contiene producto se ajusta utilizando un amortiguador de neutralización que resulta en no más de 40 mm de la fuerza iónica del fluido que contiene producto.
- 25 60. El método de la reivindicación 57, en donde el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajusta utilizando un amortiguador de neutralización que resulta

00216

en no más de 60 mm de la fuerza iónica del fluido que contiene producto.

61. El método de la reivindicación 57, en donde el pH y la conductividad del fluido que contiene producto se ajusta utilizando un amortiguador de neutralización que resulta en no más de 80 mm de la fuerza iónica del fluido que contiene producto.
62. El método de la reivindicación 57, en donde el amortiguador de elución comprende moléculas con un grupo aniónico cargado con un pKa de 2-5.
63. El método de la reivindicación 62, en donde el amortiguador de elución comprende adicionalmente moléculas con un grupo catiónico cargado con un pKa de 6.5-10.
64. El método de la reivindicación 57, en donde el amortiguador de elución comprende moléculas que son zwitteriones a pHs entre 4 y 9.
65. El método de la reivindicación 64, en donde los zwitteriones se seleccionan del grupo que consiste de glicina; 1,4-piperazinabis-(ácido etanosulfónico); glicilglicina; ácido ciclopentanotetra-1,2,3,4-carboxílico; ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico; ácido 2-(N-morfolino)propano-

sulfónico; ácido N-tris(hidroxiometil)metil-2-aminoetano
sulfónico; ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-
etanosulfónico; ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-
piperazinapropano sulfónico; N-
5 tris(hidroxiometil)metilglicina; glicinamida; N,N-bis(2-
hidroxiethyl)glicina; ácido N-tris(hidroxiometil)metil-2-
aminopropano sulfónico; y N-glicil-glicina.

10 66. El método de la reivindicación 65, en donde los
zwiteriones comprenden glicina.

67. El método de la reivindicación 57, en donde la fuerza
iónica del fluido de carga es no más de 100 mM.

15 68. El método de la reivindicación 57, en donde la fuerza
iónica del fluido de carga es no más de 50 mM.

69. El método de la reivindicación 57, en donde la fuerza
iónica del fluido de carga es no más de 25 mM.

20

70. El método de la reivindicación 57, en donde la fuerza
iónica del fluido de carga es no más de 10 mM.

25 71. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
en donde el medio remueve al menos 90% de las impurezas
seleccionadas del grupo que consiste de proteínas de
célula anfitriona, ácidos nucleicos, variantes de
productos, endotoxinas, y Proteína A.

72. El método de la reivindicación 71, en donde el medio
remueve al menos 99% de las impurezas seleccionadas del
grupo que consiste de proteínas de célula anfitriona,
5 ácidos nucleicos, variantes de productos, endotoxinas, y
Proteína A.

73. El método de la reivindicación 72, en donde el medio
remueve al menos 99.9% de las impurezas seleccionadas
10 del grupo que consiste de proteínas de célula
anfitriona, ácidos nucleicos, variantes de productos,
endotoxinas, y Proteína A.

74. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
15 en donde la masa de producto total que se une al medio
es al menos 10% de la masa de producto total cargada en
el medio.

75. El método de la reivindicación 74, en donde la masa de
20 producto total que se une al medio es al menos 20% de la
masa de producto total cargada en el medio.

76. El método de la reivindicación 75, en donde la masa de
producto total que se une al medio es al menos 30% de la
25 masa de producto total cargada en el medio.

p001j

77. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la carga del producto en el medio es al menos 10 mg de producto por mL de medio.

5 78. El método de la reivindicación 77, en donde la carga del producto en el medio es al menos 50 mg de producto por mL de medio.

79. El método de la reivindicación 78, en donde la carga del
10 producto en el medio es al menos 100 mg de producto por mL de medio.

80. El método de la reivindicación 79, en donde la carga del
15 producto en el medio es al menos 500 mg de producto por mL de medio.

81. El método de la reivindicación 80, en donde la carga del
20 producto en el medio es al menos 1000 mg de producto por mL de medio.

82. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la concentración de producto en el fluido de carga es al menos 1 mg de producto por mL de fluido de carga.

25 83. El método de la reivindicación 82, en donde la concentración de producto en el fluido de carga es al menos 5 mg de producto por mL de fluido de carga.

00000

84. El método de la reivindicación 83, en donde la concentración de producto en el fluido de carga es al menos 10 mg de producto por mL de fluido de carga.

5

85. El método de la reivindicación 84, en donde la concentración de producto en el fluido de carga es al menos 50 mg de producto por mL de fluido de carga.

10 86. El método de la reivindicación 85, en donde la concentración de producto en el fluido de carga es al menos 100 mg de producto por mL de fluido de carga.

15 87. El producto purificado preparado por el método de la reivindicación 1.

88. El producto purificado preparado por el método de la reivindicación 2.

20 89. El producto purificado preparado por el método de la reivindicación 3.

25 90. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de proteína por mL de medio; y

00001

recuperar la proteína purificada en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 5 91. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1 ; y
recuperar la proteína purificada en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 15 92. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

20 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de proteína por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; y

25 recuperar la proteína purificada en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

93. La proteína purificada preparada por el método de la reivindicación 90.

00222

94. La proteína purificada preparada por el método de la reivindicación 91.

5 95. La proteína purificada preparada por el método de la reivindicación 92.

96. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
10 comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de anticuerpo por mL de medio; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
15 columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

97. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
20 comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1 ; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
25 columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

80923

98. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

5 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; y

10 recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

99. El anticuerpo purificado preparado por el método de la reivindicación 96.

15

100. El anticuerpo purificado preparado por el método de la reivindicación 97.

20

101. El anticuerpo purificado preparado por el método de la reivindicación 98.

102. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

25

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de producto por mL de medio; en donde

00000

las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y

recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

5

103. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

10

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y

15

recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

104. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

20

pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de producto por mL de medio y definido por un coeficiente de partición

25

de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y

00005

recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 5 105. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 mg de proteína por mL de medio; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y
recuperar la proteína purificada en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
15 esencialmente isocrático.

106. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

20 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y
recuperar la proteína purificada en el efluente de la
25 columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

00226

107. Un método para recuperar una proteína purificada de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

5 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de proteína por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y
10 recuperar la proteína purificada en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

108. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

15 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de anticuerpo por mL de medio; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y
20 recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

25 109. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

00007

5 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

10 110. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

15 pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación se identifican en una etapa de selección; y recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado

20 esencialmente isocrático.

111. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

25 pasar el fluido de carga a través de un medio de intercambio de ión cargado en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de

00000

anticuerpo por mL de medio; en donde las condiciones de
operación comprenden fuerzas iónicas y niveles de pH; y
recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
5 esencialmente isocrático.

112. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un
fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de un medio de
intercambio de ión cargado en condiciones de operación
definidas por un coeficiente de partición de al menos
0.1; en donde las condiciones de operación comprenden
fuerzas iónicas y niveles de pH; y
15 recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
esencialmente isocrático.

113. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un
20 fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio de
intercambio de ión cargado en condiciones de operación
que originan que el medio se una a al menos 1 a
25 aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y
definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en
donde las condiciones de operación comprenden fuerzas
iónicas y niveles de pH; y

00000

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 5 114. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de operación que origina que la resina se una a al menos 1 mg de anticuerpo por mL de resina; en donde las condiciones de operación comprenden concentraciones de sal, fuerzas iónicas y niveles de pH; y
15 recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 20 115. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

25 pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de operación definidas por un coeficiente de partición de al menos 0.1; en donde las condiciones de operación comprenden concentraciones de sal, fuerzas iónicas y niveles de pH; y

00220

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 5 116. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación comprenden concentraciones de sal, fuerzas iónicas y niveles de pH;

15 y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 20 117. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

25 pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía hidroxipatita en condiciones de operación que origina que la resina se una a al menos 1 mg de anticuerpo por mL de resina; en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH, fuerzas iónicas, concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio,

00231

concentraciones de arginina, concentraciones de glicina,
y concentraciones HEPES; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
5 esencialmente isocrático.

118. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un
fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
comprende las etapas de:

10 pasar el fluido de carga a través de una resina de
cromatografía hidroxipatita en condiciones de operación
definidas por un coeficiente de partición de al menos
0.1; en donde las condiciones de operación comprenden
niveles de pH, fuerzas iónicas, concentraciones de
15 fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de
arginina, concentraciones de glicina, y concentraciones
HEPES; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la
columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado
20 esencialmente isocrático.

119. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un
fluido de carga que incluye una o más impurezas, que
comprende las etapas de:

25 pasar el fluido de carga a través de una resina de
cromatografía hidroxipatita en condiciones de operación
que originan que el medio se una a al menos 1 a
aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y

00000

definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH, fuerzas iónicas, concentraciones de fosfato, concentraciones de calcio, concentraciones de arginina, concentraciones de glicina, y concentraciones HEPES; y recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

- 10 120. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:
- pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada en condiciones de operación que origina que la resina se una a al menos 1 mg de anticuerpo por mL de resina; en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH y niveles de contraligando; y recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

121. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:
- pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada en condiciones de operación definidas por un coeficiente de

00230

partición de al menos 0.1; en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH y niveles de contraligando; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

122. Un método para recuperar un anticuerpo purificado de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de una resina de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada en condiciones de operación que originan que el medio se una a al menos 1 a aproximadamente 70 mg de anticuerpo por mL de medio y definido por un coeficiente de partición de 0.3 a 20; en donde las condiciones de operación comprenden niveles de pH y niveles de contraligando; y

recuperar el anticuerpo purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

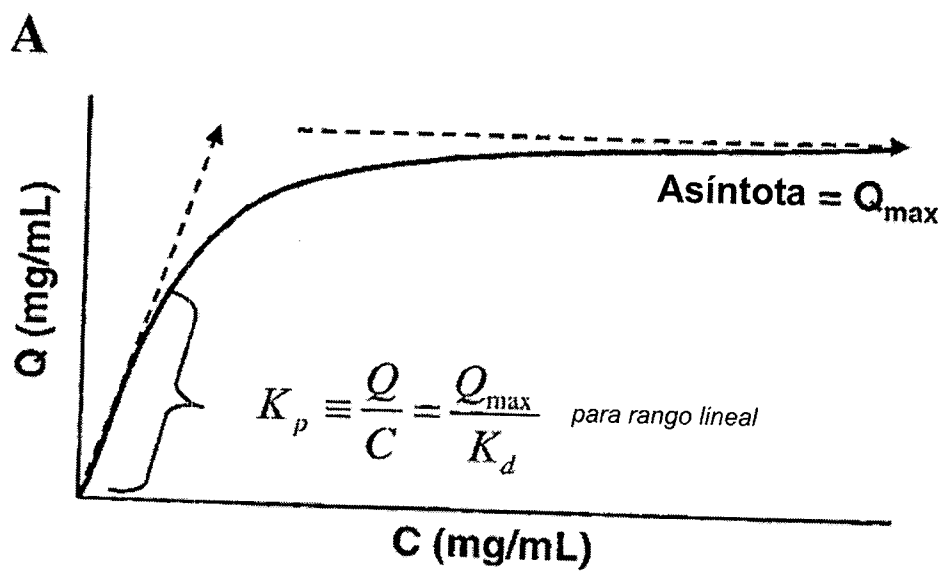
00231

UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN DÉBIL**RESUMEN**

5

Esta invención se relaciona con métodos para usar cromatografía de partición débil para la purificación de un producto desde un fluido de carga que contiene una o más impurezas. Adicionalmente la invención se relaciona con
10 métodos de cromatografía de partición débil definidos mediante las condiciones operativas que causan que un medio ligue por lo menos 1 mg de producto por ml de medio, o alternativamente definido, por un coeficiente de partición de por lo menos 0,1.

15

FIGURA 1

1B

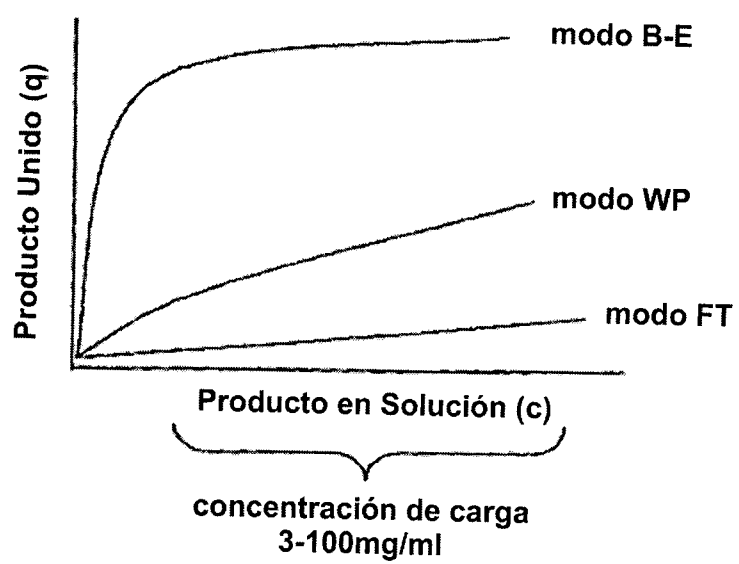
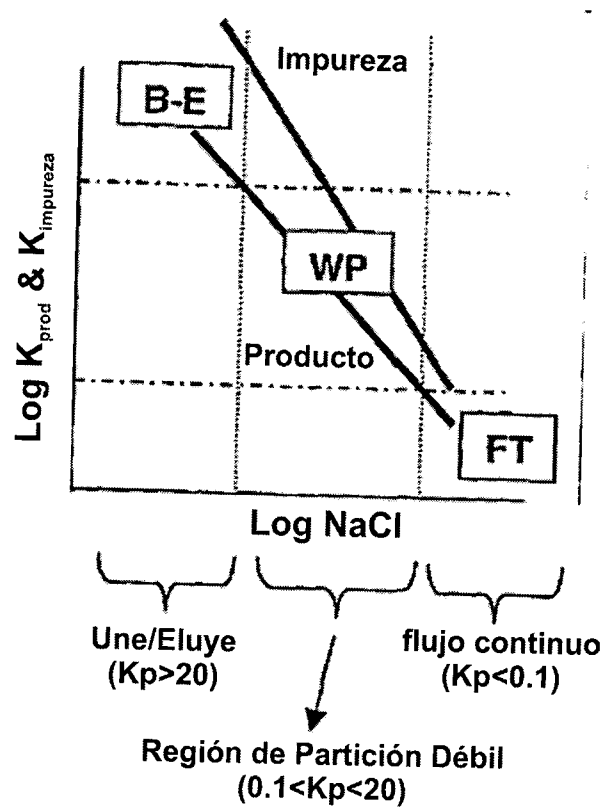


FIGURA 2

A



2B

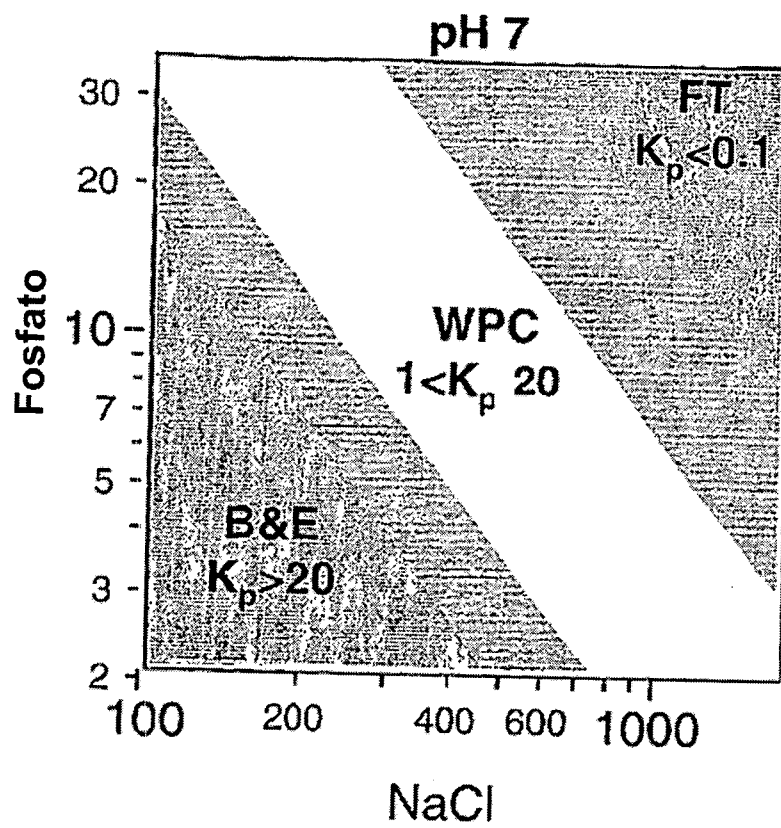
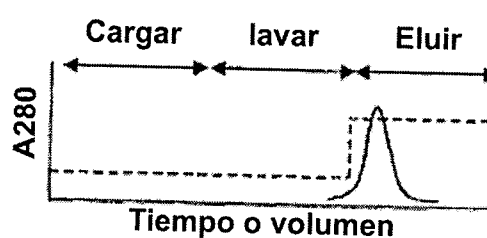
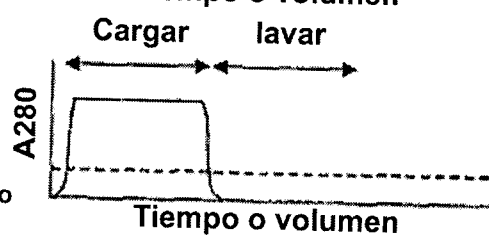


FIGURA 3**•Unir-Eluir (B-E)**

- ▶ K_{prod} alto >20
- ▶ Límite de capacidad: masa en producto en resina (sin volumen de carga)
- ▶ cambio en fase móvil para eluir el producto

**•flujo continuo (FT)**

- ▶ K_{prod} muy bajo <0.1
- ▶ Límite de capacidad: volumen y progreso de impureza
- ▶ isocrático
- ▶ cromatograma con progreso rápido, lavado

**•Partición Débil**

- ▶ K_{prod} intermedio $0.1 < K < 20$
- ▶ Capacidad mejorada sobre el modo FT (masa y volumen de carga)
- ▶ Isocrático
- ▶ lavado de revestimiento, progreso retrasado

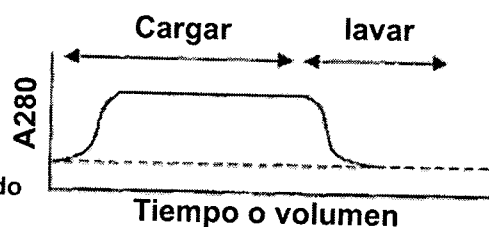


FIGURA 6

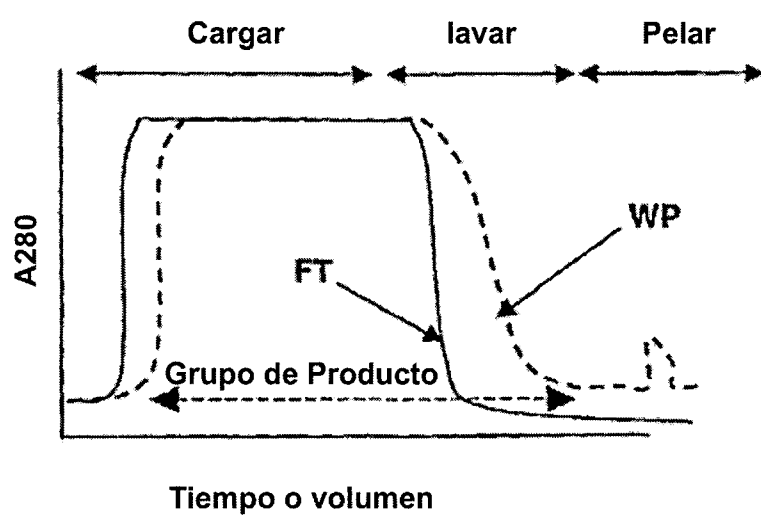


FIGURA 5

7/15

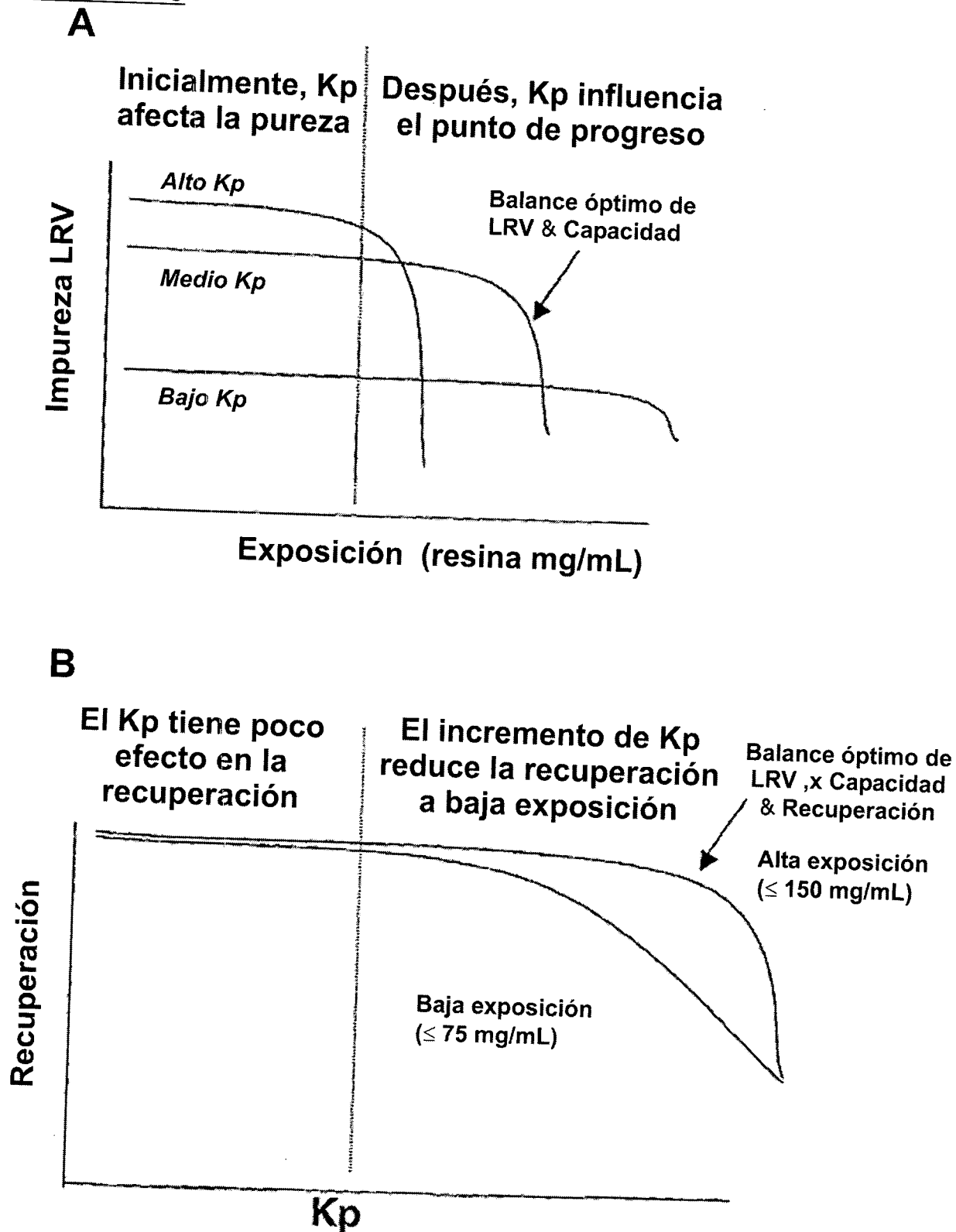


FIGURA 6

8/15

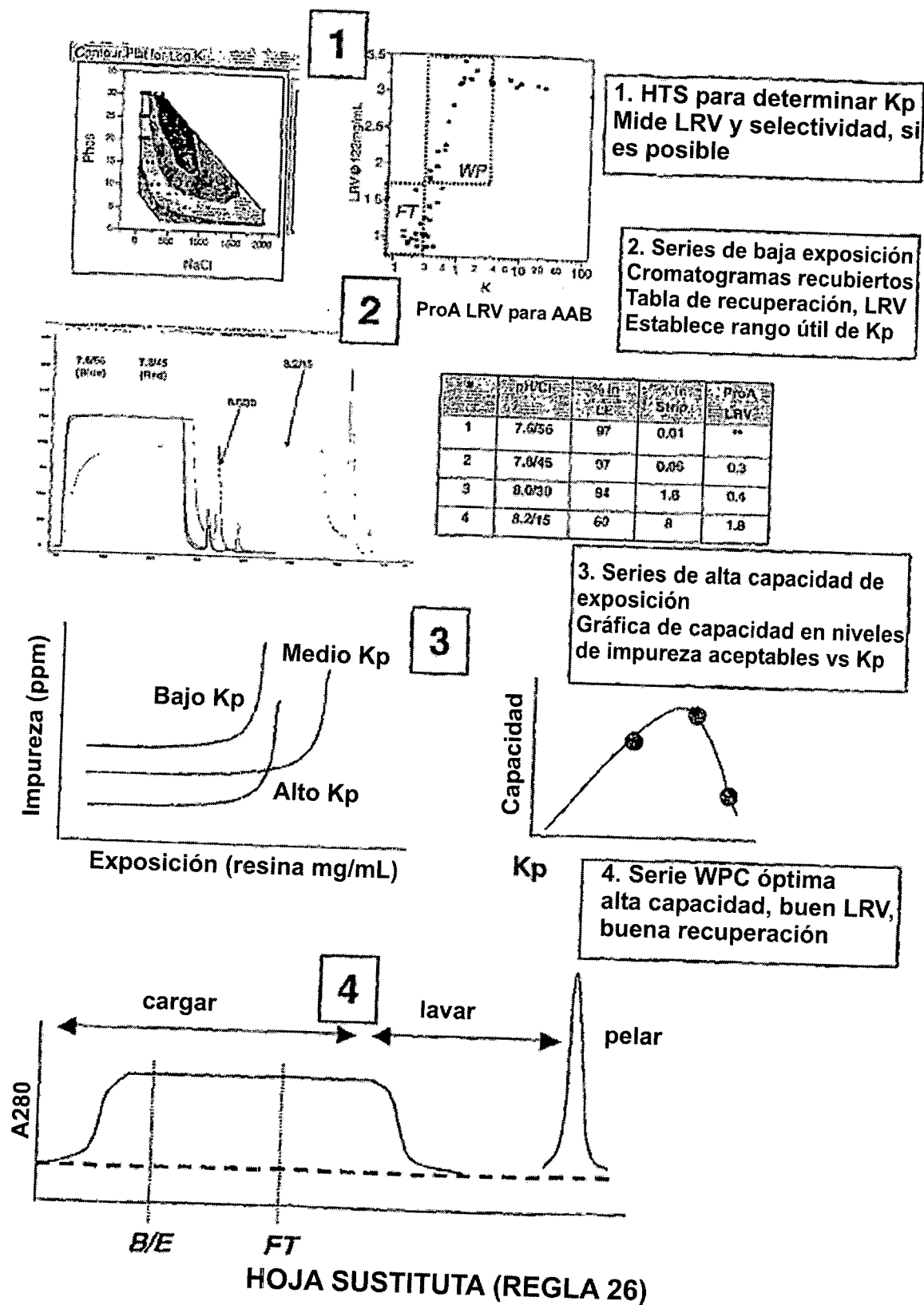
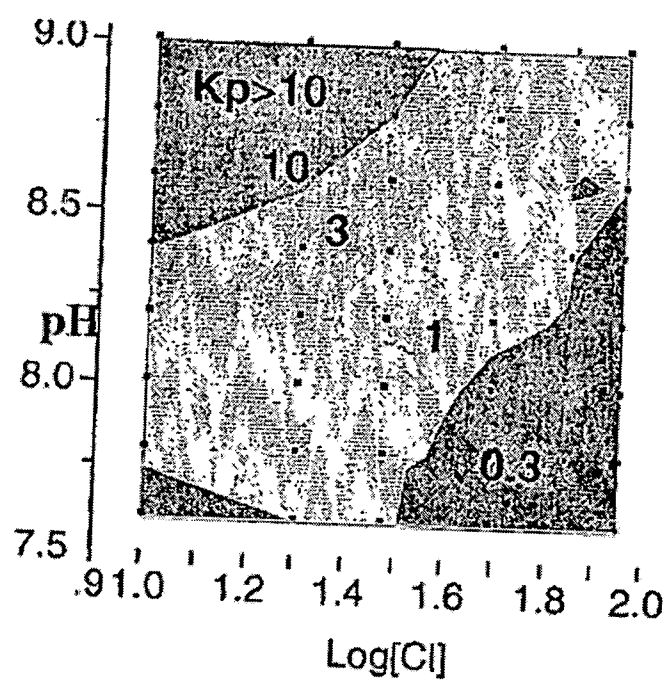
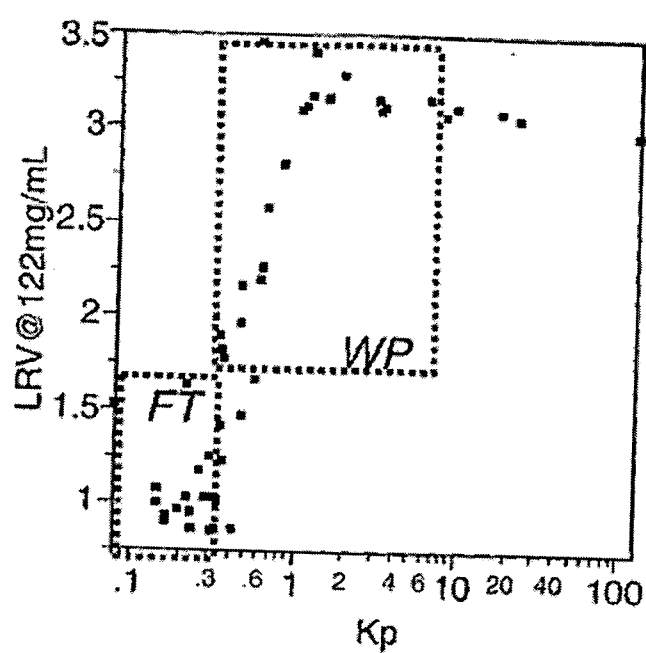


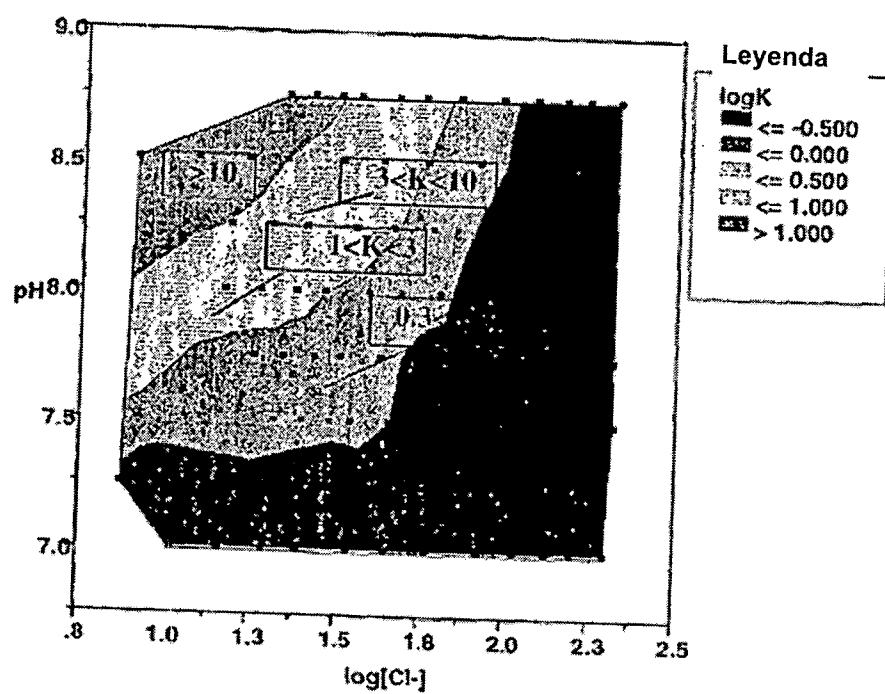
FIGURA 7

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

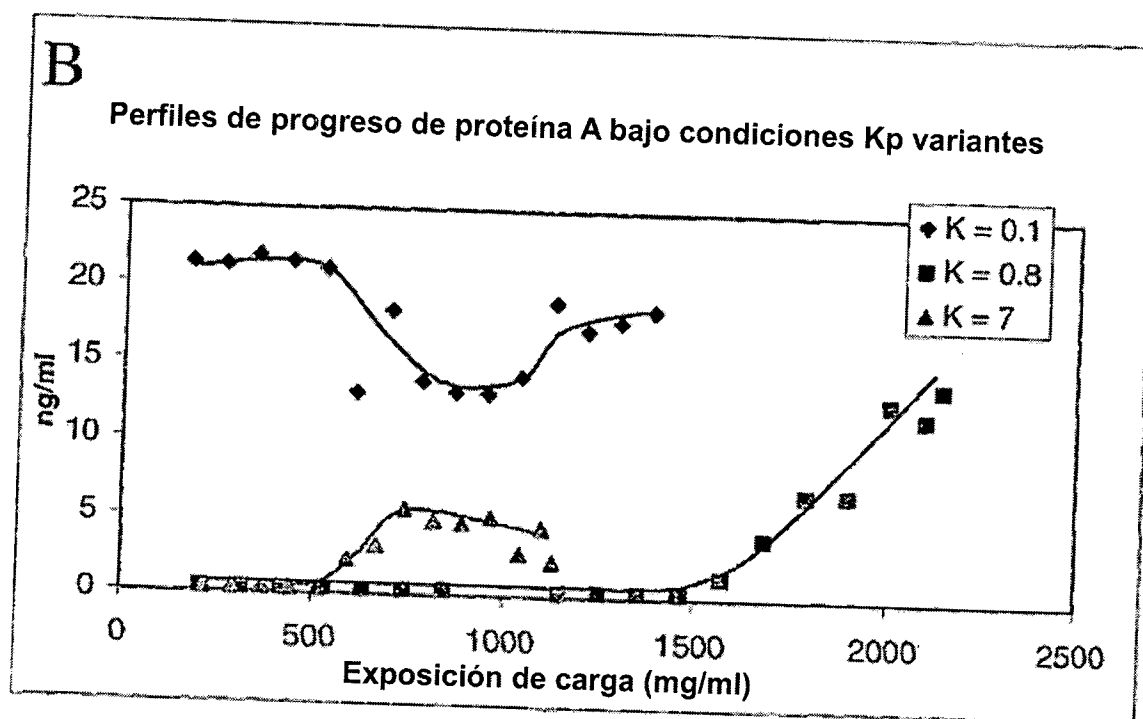
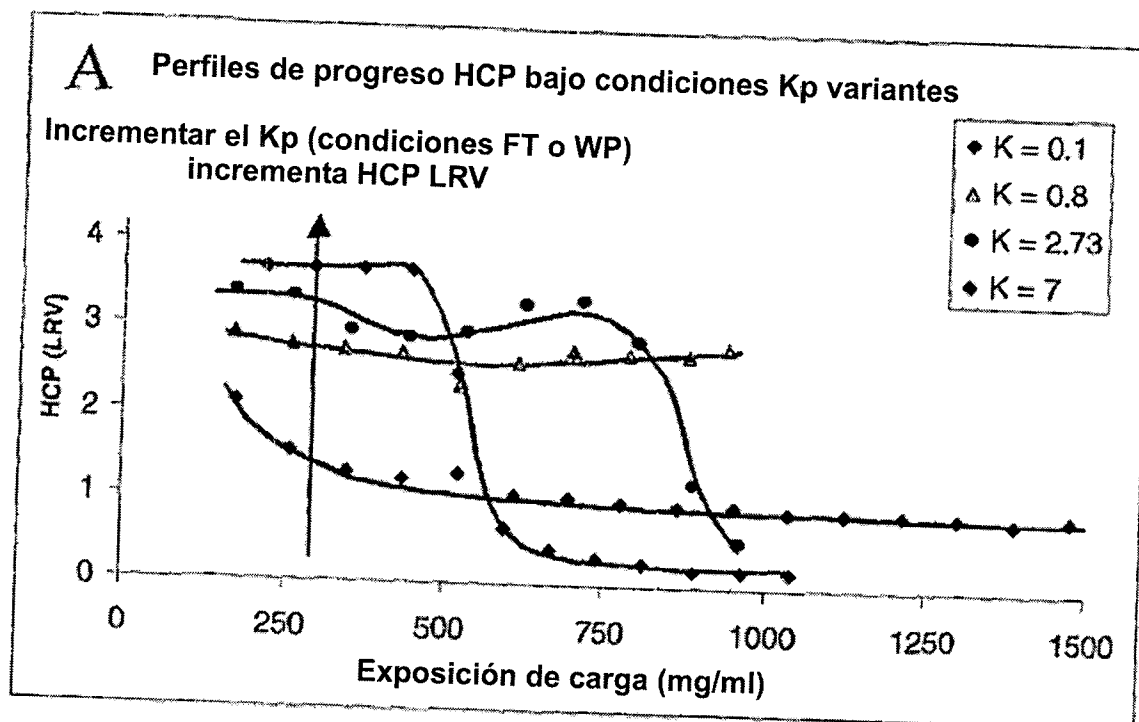
FIGURA 8

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIGURA 9



12/15

FIGURA 10

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIGURA 11

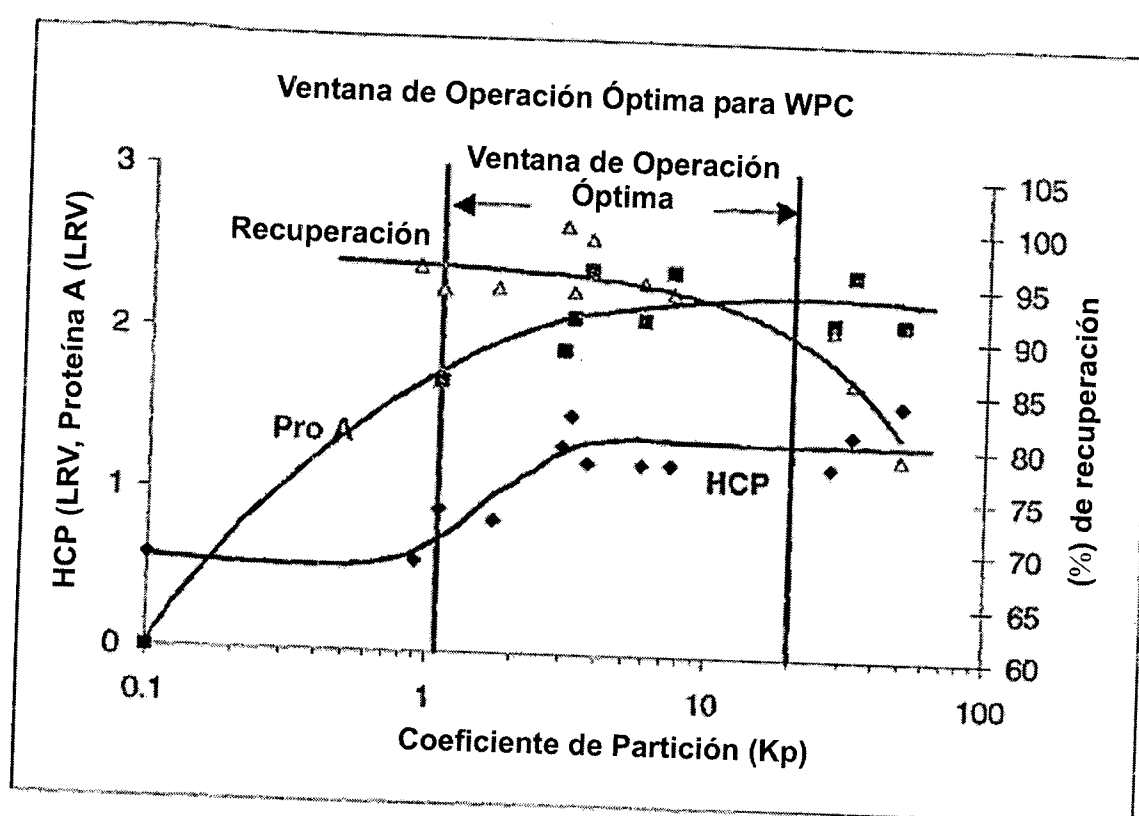


FIGURA 12

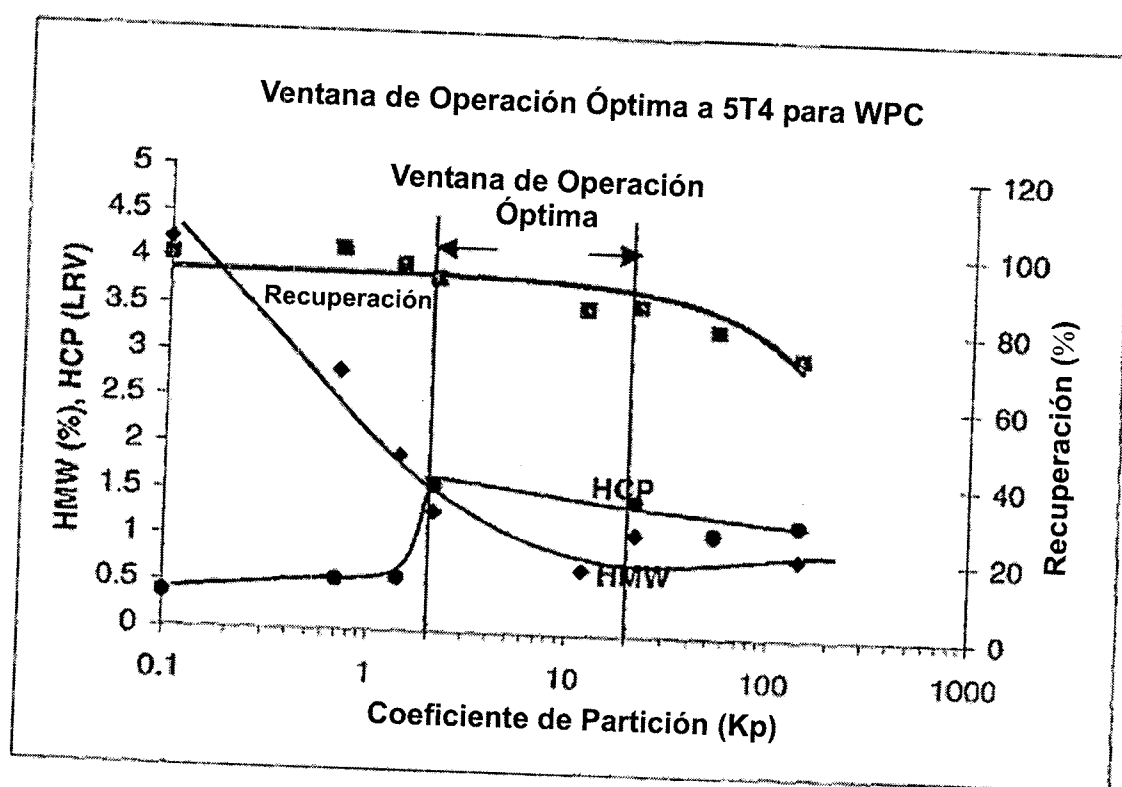
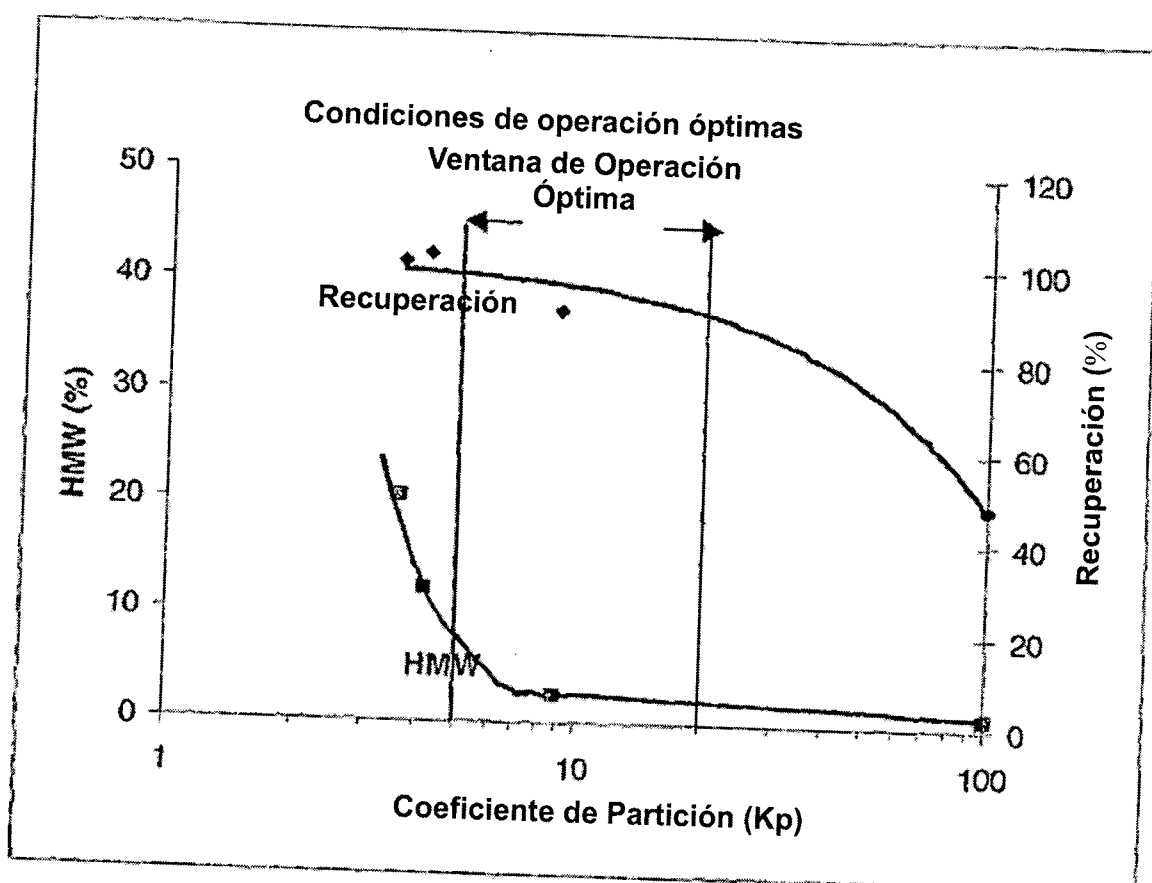


FIGURA 13



PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/008919

00000

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

LEW, Belinda
Wilmer cutler Pickering Hale and Dorr LLP
The Willard Office Building
1455 Pennsylvania Avenue, Nw
Washington, DC 20004
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

IMPORTANT NOTIFICATION

Date of mailing (day/month/year) 07 June 2006 (07.06.2006)	International filing date (day/month/year) 10 March 2006 (10.03.2006)
Applicant's or agent's file reference 0036119.00179WO1	Priority date (day/month/year) 11 March 2005 (11.03.2005)
International application No. PCT/US2006/008919	International publication date (day/month/year) Not yet published
Applicant WYETH et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
11 March 2005 (11.03.2005)	60/660,437	US	08 May 2006 (08.05.2006)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 71 30
Form PCT/IB/304 (October 2005)	Telephone No. +41 22 338 99 32

1/CVIZIA8S0

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A01H 1/00	
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) WYETH	
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) BROWN, Paul COFFMAN, Jon y Otros	
	60/660,437	11/03/05	US	(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 11/10/07			(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha: 21/09/06	
	Fecha de presentación de la solicitud: 10/03/06			N° publicación: WO/2006/099308	
	No. de solicitud PCT/US2006/008919				
(54) Titulo: UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN DÉBIL					

Reivindicación(es):

1. Un método para recuperar un producto de un fluido de carga que incluye una o más impurezas, que comprende las etapas de:
pasar el fluido de carga a través de un medio en condiciones de operación que originan que el medio se una al menos 1 mg de producto por mL de medio; y
recuperar el producto purificado en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y cualquier lavado esencialmente isocrático.

Retiro folios 252 y 253
Tijeras

254

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-092447- -00000-0000

Fecha: 2007-09-07 15:55:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

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

COMPLETA []

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 _____

Carrera 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