

PROCESO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA

DOMINIO TÉCNICO

Esta divulgación se refiere a un método para la purificación de proteínas.

ANTECEDENTES

Con el creciente número de candidatos terapéuticos proteicos, especialmente los anticuerpos monoclonales (mAbs) que ingresan en varias etapas de desarrollo, las compañías biofarmacéuticas están buscando cada vez más soluciones innovadoras para entregar los proyectos. Para el desarrollo del proceso de fabricación de anticuerpos, mantener los atributos de calidad deseados al tiempo que se reduce el tiempo de comercialización, la rentabilidad y la flexibilidad de fabricación son cuestiones clave en el competitivo mercado actual. Dado que las terapias con anticuerpos pueden requerir grandes dosis durante un largo período de tiempo, la sustancia farmacológica debe producirse en grandes cantidades con eficiencia de costo y tiempo para cumplir con los requisitos clínicos y allanar el camino hacia la comercialización. Este también es el caso de las proteínas terapéuticas recombinantes que no sean anticuerpos monoclonales, incluyendo, pero sin limitarse a, las proteínas de fusión, enzimas terapéuticas y fragmentos de anticuerpos.

En general, las proteínas se producen mediante cultivo celular, utilizando líneas celulares, líneas celulares bacterianas o virus diseñados para producir la proteína de interés. Las líneas celulares se alimentan con un medio de crecimiento complejo que comprende azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento. Para su uso como terapia humana, las moléculas objetivo o la proteína objetivo expresadas por las células cultivadas deben tratarse para alcanzar un alto nivel de pureza. Después de las purificaciones iniciales, se usa un paso de purificación final, a menudo llamado pulido, para obtener la pureza final deseada.

Aunque es necesario para lograr un alto nivel de pureza, el pulido puede conducir a una pérdida significativa de proteínas. La mayoría de las metodologías de pulido conocidas hasta la fecha comprenden varios subpasos de pulido, lo que nuevamente contribuye a la pérdida del producto deseado.

El objetivo de la presente descripción es proporcionar un método que permita pulir una alimentación de proteína con un mínimo de pérdida de proteína y asegurar una alta calidad de proteína. En segundo lugar, también es el objetivo proporcionar una metodología con una cantidad limitada de pasos operativos que aún proporcione un alto rendimiento de proteínas y con una reducción significativa de los gastos de operación (OPEX).

RESUMEN

Aquí se describen métodos para usar un intercambiador de iones multimodal que comprende restos hidrófobos y que se carga en condiciones de alta conductividad. Estas condiciones causan un efecto kosmotrópico, en el que la proteína de interés estará más expuesta a los restos hidrófobos del intercambiador o tendrá una mayor afinidad con este último, permitiendo una interacción hidrofóbica entre dicha proteína y el intercambiador. Permitir que el método se ejecute en condiciones de alta conductividad mejora la selectividad de la proteína de interés hacia su forma monomérica. Además, se forman menos agregados de proteínas en estas condiciones. Al mismo tiempo, todos los otros atributos principales del intercambio iónico se pueden preservar: reducción de proteínas de la célula huésped, ADN de la célula huésped y reducción de partículas virales.

Aquí se describen métodos para purificar una molécula. En algunas modalidades, la molécula es una proteína, péptido, aminoácido o ácido nucleico. En algunas modalidades, la molécula es una proteína. En algunas modalidades, la proteína está presente en una alimentación. En algunas modalidades, el método comprende una etapa de cromatografía multimodal, en la que la alimentación se pone en contacto con un intercambiador de iones multimodal. En algunas

modalidades, el intercambiador de iones multimodal comprende un ligando con un resto hidrófobo y un resto cargado. En algunas modalidades, la unión de la proteína de interés al intercambiador se produce en condiciones de alta conductividad. En algunas modalidades, la alimentación se complementa con una cantidad adecuada de sal o una combinación de sales antes de la etapa de cromatografía multimodal. En algunas modalidades, la alimentación se complementa con una cantidad adecuada de sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una mezcla de los mismos antes de la etapa de cromatografía multimodal. En algunas modalidades, la concentración de sal de la alimentación durante la unión está entre 0,5 M y 3 M. En algunas modalidades, la concentración de sal de la alimentación durante la unión está entre 1 M y 2 M. En algunas modalidades, el resto está cargado positivamente o cargado negativamente. En algunas modalidades, el intercambiador multimodal tiene restos cargados tanto positiva como negativamente. En algunas modalidades, la alimentación se complementa con una cantidad adecuada de una solución ácida o con una cantidad adecuada de una solución alcalina antes de la etapa de cromatografía multimodal. En algunas modalidades, la unión se produce a un pH de aproximadamente 7 a 9. En algunas modalidades, el paso de cromatografía multimodal es usado como paso de pulido. En algunas modalidades, el paso de cromatografía multimodal es el único paso de pulido. En algunas modalidades, la etapa de pulido está precedida por una etapa de clarificación de una cosecha de cultivo celular y / o una etapa de cromatografía. En algunas modalidades, la proteína se eluye del intercambiador multimodal mediante elución en gradiente, disminuyendo gradualmente el pH de un tampón de elución por debajo de 7 y/o disminuyendo gradualmente la concentración de sal en un tampón de elución por debajo de 0,5 M. En algunas modalidades, la proteína se eluye del intercambiador multimodal mediante elución isocrática con un tampón de elución, en el que el tampón de elución tiene una concentración de sal de entre 10 mM y 500 mM y/o un pH de entre 5,5 y 7. En algunas modalidades, la alimentación comprende virus inactivados. En algunas modalidades, la alimentación para cromatografía

multimodal es una fracción de flujo de una etapa de cromatografía o una fracción derivada de la misma. En algunas modalidades, la proteína es un anticuerpo. En algunas modalidades, el método se realiza en modo de cromatografía por lotes o en modo de cromatografía continua.

Aquí se divulgan kits. En algunas modalidades, el kit comprende una resina de cromatografía multimodal. En algunas modalidades, la resina de cromatografía multimodal comprende un ligando con un resto hidrófobo y un resto cargado. En algunas modalidades, el kit comprende un tampón con una concentración de sal de entre 0,5 y 3 M y/o una conductividad superior a 75 mS / cm.

Aquí se describen intercambiadores de iones multimodales. En algunas modalidades, el intercambiador de iones multimodal comprende un ligando con un resto hidrófobo y un resto cargado. En algunas modalidades, la molécula es una proteína, una proteína está unida al resto hidrófobo. En algunas modalidades, la proteína antes de la carga está presente en un tampón con una concentración de sal de entre 0,5 y 3 M y/o una conductividad superior a 75 mS/cm. En algunas modalidades, el tampón comprende una concentración de sal de entre 0,5 y 3 M y/o una conductividad superior a 75 mS/cm. En algunas modalidades, el tampón comprende un pH de aproximadamente 7 a 9.

FIGURAS

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

La **Figura 1** es un diagrama de flujo que muestra una visión general del proceso comercial a gran escala de producción y purificación de proteínas.

La **figura 2** es un diagrama de flujo que representa una visión general del método para purificar una proteína de acuerdo con una modalidad de la divulgación.

La **figura 3** muestra un cromatograma que acompaña al experimento realizado en el ejemplo 2.

DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en este documento, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Por medio de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente divulgación.

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Un", "una" y "el/la", como se usa en el presente documento, se refieren tanto al singular como al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "un compartimento" se refiere a uno o más de un compartimento.

"Alrededor", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de +/- 20% o menos, preferiblemente +/- 10% o menos, más preferiblemente +/- 5% o menos, incluso más preferiblemente +/- 1% o menos, y aún más preferiblemente +/- 0.1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones son apropiadas para realizar en la invención divulgada Sin embargo, debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "alrededor" también se describe específicamente.

"Comprender", "que comprende" y "comprende" y "compuesto por" como se usa en el presente documento son sinónimos de "incluir", "que incluye", "incluye" o "contiene", "que contiene", "contiene" y son inclusivos o términos abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, por ejemplo, componente y no excluyen ni precluyen la presencia de componentes, características, elementos, miembros, pasos adicionales no enunciados, conocidos en la técnica o divulgados en la misma.

La recitación de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de ese rango, así como los puntos finales recitados.

La expresión "% en peso" (porcentaje en peso), aquí y en toda la descripción, a menos que se defina lo contrario, se refiere al peso relativo del componente respectivo en función del peso total de la formulación. La expresión "1% p/p" se refiere a lo que puede entenderse como 1 g de componente respectivo por 100 g de la formulación, la expresión "1% p/v" se refiere a lo que podría entenderse como 1 g de componente respectivo por 100 ml. de la formulación, la expresión "1% v/v" se refiere a lo que puede entenderse como 1 ml. de componente respectivo por 100 ml. de formulación.

"Cosecha de cultivo celular", "cosecha de cultivo" y "cosecha" se usan como sinónimos y se refieren al cultivo celular no aclarado obtenido a partir del cultivo de células en un biorreactor. Las células cultivadas o las células criadas también se denominan células huésped.

"Biorreactor" se refiere a cualquier dispositivo o sistema que soporte un entorno biológicamente activo, por ejemplo, para el cultivo de células u organismos para la producción de un producto biológico. Esto incluiría pilas de células, botellas rodantes, batidoras, matraces, biorreactores de suspensión de tanque agitado, biorreactores de perfusión de lecho fijo de alta densidad celular, etc.

La "purificación" se refiere a la reducción sustancial de la concentración de una o más impurezas o contaminantes objetivo en relación con la concentración de la molécula de interés, tal como una proteína de interés.

"Proteína" se refiere a cualquiera de una clase de compuestos orgánicos nitrogenados que tienen moléculas grandes compuestas de una o más cadenas de aminoácidos. La "proteína" puede ser cualquier tipo de proteína tal como anticuerpos (monoclonales), fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, enzimas, proteínas recombinantes, péptidos, polipéptidos u otras biomoléculas expresadas por las células.

"Anticuerpo" se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina, fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o proteína de fusión de inmunoglobulina, monoclonal o policlonal, derivada de líneas celulares humanas u otras de animales, incluidas formas naturales o genéticamente modificadas tales como humanizadas, humanas, quiméricas, sintéticas, recombinantes, híbrido, mutado, injertado, y anticuerpos generados in vitro. Los anticuerpos de inmunoglobulina natural comúnmente conocidos incluyen IgA (dimérico), IgG, IgE, IgG e IgM (pentamérico).

Una "variante de carga de anticuerpo" como se usa en el presente documento es un anticuerpo o fragmento del mismo en el que el anticuerpo o fragmento del mismo que se ha modificado desde su estado nativo de tal manera que se altera la carga del anticuerpo o fragmento del mismo. Las variantes de carga de anticuerpos a menudo se denominan especies de anticuerpos ácidos, neutros y / o básicos.

"Agregado de proteína" o "agregado de una proteína" se refiere a una asociación de al menos dos moléculas de proteína. La asociación puede ser covalente o no covalente sin tener en cuenta el mecanismo por el cual se asocian las moléculas de proteína. La asociación puede ser directa entre las moléculas de proteína o indirecta a través de otras moléculas que unen las moléculas de proteína. Los ejemplos de estos últimos incluyen, pero no se limitan a, enlaces disulfuro con otras proteínas, asociaciones hidrofóbicas con lípidos, asociaciones de carga con ADN, asociaciones de afinidad con proteína lixiviada A o asociaciones de modo mixto con múltiples componentes.

"Inactivado viral" significa que una alimentación que comprende una proteína de interés comprende además virus inactivos o partículas virales previamente existentes en su forma activa en un biorreactor.

Con "fracción de flujo continuo" se entiende aquí a al menos parte de la fracción que contiene proteína cargada que sale de la columna cromatográfica sustancialmente a la misma velocidad que el fluido de elución. Esta fracción no se retiene sustancialmente en la columna durante la elución. Por lo tanto, las condiciones se eligen de manera que no los anticuerpos sino las impurezas estén unidas a los respectivos materiales cromatográficos.

La "floculación" se refiere a la agregación, precipitación y/o aglomeración de partículas solubles (p. Ej., Componentes de cromatina) y/o insolubles (p. Ej., Células) causadas por la adición de un agente floculante adecuado a una suspensión. Al aumentar el tamaño de partícula de los componentes insolubles presentes en la suspensión, se mejora la eficiencia de las separaciones sólido / líquido, como por filtración o centrifugación. La floculación de un cultivo celular conduce a la formación de "flóculos" que comprenden impurezas de la célula huésped, tales como material celular que incluye células y restos celulares o proteínas de la célula huésped, ADN u otros componentes presentes en el mismo.

Como se usa en el presente documento, "pulido" se refiere a un paso, preferiblemente un paso cromatográfico, usado para eliminar impurezas residuales de la célula huésped, impurezas relacionadas con el producto (fragmentos del producto y / o especies agregadas o variantes de carga) y contaminantes de virus de un alimento de ese modo (además) purificando la proteína de interés. El pulido suele ir precedido de un paso de captura de proteínas.

La cromatografía de "modo mixto" y "multimodal" se usan indistintamente aquí y se refieren a un método cromatográfico en el que la separación de componentes en una fase móvil se basa en más de un tipo de interacción entre una fase estacionaria y los componentes de la fase móvil. La cromatografía multimodal se basa, por ejemplo, en interacciones hidrofóbicas o no hidrofóbicas simultáneas e interacciones electrostáticas entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Un "intercambiador de iones multimodal" se refiere a un componente de la fase sólida que es adecuado para su uso en cromatografía multimodal y que tiene un resto cargado. Los términos "intercambiador de iones multimodal", "intercambiador de iones de modo mixto", "ligando de intercambio de iones multimodal" y "ligando de intercambio de iones de modo mixto" se usan aquí como sinónimos.

Como se usa en el presente documento, los términos "kosmotropico" o "kosmotropos" se refieren ampliamente a sustancias que, sin estar vinculadas por la teoría, se cree que contribuyen a la estabilidad y estructura de las interacciones agua-agua. Los kosmotropos típicamente causan que las moléculas de agua interactúen favorablemente, lo que también estabiliza las interacciones intermoleculares en las macromoléculas. Los kosmotropos pueden ser iónicos y / o no iónicos.

"Condiciones de alta conductividad" deben entenderse como aquellas condiciones o medidas que existen durante la carga de una alimentación o tampón de dicha alimentación y la unión de una alimentación o tampón de dicha alimentación a una resina mediante la cual la conductividad de la alimentación o tampón de dicha alimentación está por encima de 75 mS/cm, más preferiblemente por encima de 85 mS/cm. A menudo, se obtiene una alta conductividad al aumentar la concentración de sal del tampón de alimentación, por ejemplo, por encima de NaCl 1 M y más. El experto es consciente de que una sal diferente tendrá un efecto diferente sobre la conductividad.

El término "fase sólida" se usa para referirse a cualquier matriz no acuosa a la que se pueden adherir uno o más ligandos o, alternativamente, en el caso de la cromatografía de exclusión por tamaño, puede referirse a la estructura de gel de una resina. La fase sólida puede ser cualquier matriz capaz de adherir ligandos de esta manera, por ejemplo, una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas, una membrana, filtro, gel, etc. Los ejemplos de materiales que pueden usarse para formar la fase sólida incluyen polisacáridos (como agarosa y celulosa) y otras matrices mecánicamente estables como sílice (p. ej. vidrio de

poro controlado), poli (estirendivinil) benceno, poliacrilamida, partículas cerámicas y derivados de cualquiera de estos.

"Compuesto tamponador" se refiere a un compuesto químico empleado con el propósito de estabilizar el pH de una solución acuosa dentro de un rango especificado. El fosfato es un ejemplo de un compuesto tamponador. Otros ejemplos comunes incluyen, entre otros, compuestos como acetato, citrato, borato, MES, Tris y HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS), entre muchos otros.

"Tampón" se refiere a una formulación acuosa que comprende un compuesto tamponador y otros componentes necesarios para establecer un conjunto específico de condiciones para mediar el control de un método de cromatografía. El término "tampón de equilibrio" se refiere a un tampón formulado para crear las condiciones iniciales de funcionamiento. "Tampón de lavado" se refiere a un tampón formulado para desplazar contaminantes no unidos de un soporte de cromatografía. "Tampón de elución" se refiere a un tampón formulado para desplazar el uno o más componentes de la matriz de cromatografía.

Se usa una "cantidad adecuada" de una solución para describir una solución que, cuando se mezcla con la alimentación o con la resina de cromatografía, promoverá la unión o adsorción de la mayoría de la proteína de interés a la resina, pero no promoverá una unión sustancial de impurezas a esa resina. Para cada proceso de purificación, se debe establecer el pH óptimo, el tipo preferido de sistema de sal y las cantidades óptimas en las soluciones de ajuste.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un primer aspecto, se describe un método para purificar una proteína, en el que dicha proteína está presente en una alimentación, y en el que dicho método comprende una etapa de cromatografía multimodal, en la que dicha alimentación se pone en contacto con un intercambiador de iones multimodal que comprende

un ligando con un resto hidrófobo y con un resto cargado, permitiendo así la unión de la proteína a dicho intercambiador, y en donde dicha unión se produce en condiciones de alta conductividad.

La cromatografía multimodal o de modo mixto combina diferentes tipos de interacciones, tales como interacción iónica, enlaces de hidrógeno e interacción hidrofóbica para permitir la separación de componentes en una mezcla (es decir, una alimentación que comprende la proteína de interés). Las propiedades de separación del ligando se modulan ajustando las condiciones en las que tiene lugar la interacción entre los componentes de la alimentación y el ligando. En el método divulgado actualmente, las fuerzas impulsoras para la unión y elución de la proteína de interés para el ligando multimodal se adaptan específicamente ajustando las condiciones de cromatografía para mejorar la separación cromatográfica de los componentes, de modo que pueda realizarse con mayor precisión y más selectivamente hacia una proteína específica de interés e incluso hacia formas específicas de la proteína de interés (p. ej. la forma monomérica de un anticuerpo)

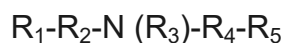
De acuerdo con el método para la purificación de proteínas descrito en este documento, la etapa de cromatografía multimodal utilizada se basa en un ligando con un resto hidrófobo así como un resto cargado y, en consecuencia, tiene capacidades tanto de intercambio iónico como de interacción hidrofóbica. Dicho grupo cargado puede ser un grupo cargado positivamente (aniónico) o un grupo cargado negativamente (catiónico).

Varios ligandos de cromatografía de modo mixto están disponibles comercialmente. Los ligandos bien conocidos en la técnica y que son compatibles con la metodología descrita actualmente son Capto-Adhere™ o Capto-Adhere™ ImpRes, Capto MMC HiScreen, Nuvia™ aPrime. En una modalidad, el intercambiador de iones multimodal comprende un grupo cargado negativamente.

En una modalidad, el intercambiador de iones multimodal comprende un grupo cargado positivamente (preferiblemente una amina o un ion de amonio cuaternario) y una estructura de anillo aromático.

Estas funcionalidades pueden acomodarse en sustituyentes / ligandos separados como una mezcla más o menos estocástica de ligandos o con ambas funcionalidades presentes en el mismo sustituyente / ligando.

Particularmente útiles son los ligandos definidos por la fórmula



donde

R_1 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido;

R_2 es una cadena de hidrocarburo que comprende 0-4 átomos de carbono;

R_3 es una cadena de hidrocarburos que comprende 1-3 átomos de carbono

R_4 es una cadena de hidrocarburos que comprende 1-5 átomos de carbono
y

R_5 es OH o H.

Los ejemplos de tales ligandos incluyen, pero sin limitación, N-bencil-N-metil etanol amina o N, N-dimetil bencilamina. En otra u otras modalidades, dicho ligando de la resina multimodal comprende además restos hidrófobos y no hidrófobos tales como un resto hidrógeno, que puede permitir una mayor interacción con la proteína de interés, dependiendo de las condiciones de unión utilizadas.

En una modalidad, dicho intercambiador multimodal tiene restos cargados tanto positiva como negativamente.

En una modalidad, dicho intercambiador multimodal comprende restos adicionales, que permiten funcionalidades de interacción adicionales distintas del intercambio iónico de dicha columna, tales como restos que permiten la interacción hidrofóbica o restos que permiten la unión de hidrógeno o cualquier otro conocido en la técnica.

Sin desear limitarse a ninguna teoría, se halló que las condiciones de alta conductividad tal como se usan en la divulgación actual dan como resultado un efecto kosmotrópico, en el que la proteína de interés está más expuesta a los

restos hidrofóbicos del intercambiador, permitiendo así una interacción hidrofóbica entre dicha proteína y el intercambiador. Por lo tanto, al cargar y unir la proteína alimentada al intercambiador de iones multimodal en condiciones de alta conductividad, se obtiene un cambio hacia las propiedades hidrofóbicas del intercambiador multimodal, por lo que la interacción de la proteína de interés con el intercambiador de iones multimodal se basa en las propiedades hidrofóbicas de dicha proteína y el resto hidrófobo del ligando de intercambio iónico multimodal.

Se encontró que el cambio mencionado anteriormente en el modo de cromatografía permite una modulación exitosa de las propiedades de separación de la resina de cromatografía multimodal, por ejemplo, selectividad hacia la forma monomérica de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo. Además, el cambio en el modo de cromatografía también permite separar selectivamente las variantes de carga de anticuerpos entre sí. Estas variantes de carga de anticuerpos a menudo se denominan especies de anticuerpos ácidos, neutros o básicos. Simultáneamente, todos los atributos principales de la cromatografía de intercambio iónico, como la reducción de las proteínas de la célula huésped y el ADN, así como la reducción de las partículas virales también se conservan. Por lo tanto, el método permite obtener una muestra de proteína altamente pura, de alta calidad.

En una modalidad, la etapa de cromatografía multimodal comprende una columna de lecho empaquetado clásico que contiene una resina, una columna que contiene material monolítico, una columna radial que contiene medio cromatográfico adecuado, una unidad de membrana de adsorción o cualquier otro dispositivo de cromatografía multimodal conocido en la técnica con el apropiado medio y los ligandos como se describe. En la columna cromatográfica, el material cromatográfico puede estar presente como material de soporte en partículas al que están unidos los ligandos según la descripción. La divulgación actual se proporciona con respecto a una etapa de cromatografía que comprende una columna que contiene una resina, sin embargo, es claro para el experto en la materia que las enseñanzas de la divulgación se pueden aplicar igualmente con

respecto a una etapa de cromatografía que comprende una columna que contiene una membrana de adsorción .

La resina de cromatografía multimodal se puede practicar en una columna de lecho empaquetado, una columna de lecho fluidizado/expandido, y/o una operación por lotes donde la resina multimodal se mezcla con la alimentación de proteínas durante un cierto tiempo. Un soporte de cromatografía en fase sólida puede ser una partícula porosa, una partícula no porosa, una membrana o un monolito. En algunas modalidades, el soporte de fase sólida que comprende el ligando multimodal se empaqueta en una columna de al menos 5 mm de diámetro interno y una altura de al menos 25 mm. Dichas modalidades son útiles, por ejemplo, para evaluar los efectos de diversas afecciones sobre una proteína particular (por ejemplo, anticuerpo). Otra modalidad emplea el soporte de fase sólida que comprende el ligando multimodal, empaquetado en una columna de cualquier dimensión requerida para soportar aplicaciones y otras operaciones escaladas. El diámetro de la columna puede variar de menos de 1 cm a más de 1 metro, y la altura de la columna puede variar de menos de 1 cm a más de 30 cm, según los requisitos de una aplicación en particular. Las aplicaciones a escala comercial normalmente tendrán un diámetro de columna (ID) de 20 cm o más y una altura de al menos 20 cm. El experto en la materia puede determinar las dimensiones de columna apropiadas.

En algunas modalidades, la columna de cromatografía de tipo membrana comprende un material de soporte en forma de una o más láminas a las que se une un ligando con un resto hidrófobo y un resto cargado (ya sea positivo o negativo). El material de soporte puede estar compuesto de material orgánico o material inorgánico o una mezcla de material orgánico e inorgánico. Materiales orgánicos adecuados son materiales a base de agarosa y metacrilato. Materiales inorgánicos adecuados son sílice, cerámica y metales.

Las condiciones de alta conductividad, según la presente descripción, se refieren a condiciones en las que la conductividad es superior a 75 mS/cm, más preferiblemente superior a 85 mS/cm, incluso más preferiblemente entre 85 y 120

mS/cm. A menudo se obtiene una alta conductividad al aumentar la concentración de sal, por ejemplo, por encima de NaCl 1 M y más. El anión de la sal puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en iones fosfato, sulfato, cloruro, acetato, bromuro, nitrato, clorato, yoduro y tiocianato. El catión de la sal puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en iones de amonio, potasio, sodio, rubidio, litio, magnesio, calcio y bario. Las sales preferidas son sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de potasio y cloruro de sodio o una mezcla de los mismos. El experto en la materia sabe que una sal diferente afectará la conductividad en un grado diferente. En una modalidad preferida, la sal se selecciona del grupo que comprende cloruro de sodio, sulfato de amonio y fosfato de potasio. Estos grupos de sales son especialmente adecuados para el método divulgado actualmente, ya que generan iones que promueven fuertemente las interacciones hidrofóbicas. La mayoría de los dispositivos de cromatografía están adaptados con equipos para monitorear la conductividad de la fase móvil o los tampones utilizados durante la cromatografía, así como la concentración de sal y/o la temperatura de la misma. La carga de la alimentación que comprende la proteína de interés bajo alta conductividad también dará como resultado la unión de la proteína de interés a la resina en condiciones de alta conductividad o alta concentración de sal.

En una modalidad, la carga de la alimentación y la unión de la proteína de interés en la resina de cromatografía multimodal se produce a un pH de aproximadamente 7 a 9 y una concentración de sal de entre 0,5 M a 3 M o una concentración de sal correspondiente a una conductividad de al menos 75 mS/cm, preferiblemente al menos 80 mS/cm, preferiblemente al menos 85 mS/cm, preferiblemente entre 80 y 120 mS/cm. En una modalidad adicional, dicha concentración de sal está entre NaCl 1 M y 2 M o fosfato de potasio 0,5 M y 1 M, respectivamente, o una concentración de sal correspondiente a una conductividad superior a 75 mS/cm, más preferiblemente superior a 85 mS/cm, preferiblemente entre 80 y 120 mS/cm. Se observó que la unión por debajo de 1M NaCl puede ser demasiado baja para cambiar el modo de interacción del intercambio aniónico (AEX) a la

cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), mientras que, por encima de 2M NaCl, se puede observar un efecto de sal y los amortiguadores serán menos rentables. Un pH inferior a 7 puede dar como resultado una unión limitada a la resina, mientras que un pH superior a 9 da como resultado la desamidación de proteínas, que es una modificación no deseada de la proteína de interés. Una condición típica podría ser un eluato de la etapa (b) o un eluato derivado del mismo a una concentración de NaCl 1 M a 2 M en un tampón HEPES o Tris (20 a 100 mM) de pH 7 a 8.

En algunas modalidades, las condiciones de la fase móvil de cromatografía (es decir, la alimentación) así como la fase sólida (es decir, la resina de cromatografía) se pueden ajustar mediante acondicionamiento o equilibrio hacia las condiciones como se describe anteriormente, antes de realizar la etapa de cromatografía multimodal. En otra modalidad, las condiciones de la fase móvil de cromatografía (es decir, la alimentación) así como la fase sólida (es decir, la resina de cromatografía) ya pueden cumplir con las condiciones requeridas, omitiendo así la necesidad de acondicionamiento o equilibrio. Preferiblemente, las condiciones usadas en las etapas de procesamiento aguas arriba que conducen a la alimentación antes de la etapa de cromatografía multimodal del método divulgado actualmente, se seleccionan para ser compatibles con la etapa de cromatografía multimodal, haciendo así que un subpaso que comprende acondicionar la alimentación antes de purificar la proteína de interés sea innecesario ahorrando tiempo y recursos cuando el método se efectúa como parte del proceso de producción de la proteína.

Debe entenderse que el ajuste o acondicionamiento de la alimentación puede lograrse mediante cualquier método conocido por la persona experta en la técnica, que incluye dilución, intercambio de tampón, titulación o cualquier combinación de los mismos.

Se puede lograr un acondicionamiento destinado a disminuir la conductividad de una alimentación diluyendo la alimentación con agua ultrapura o con una solución tampón baja en sal.

Se puede lograr un acondicionamiento que tenga como objetivo aumentar la conductividad de la alimentación mediante la titulación de la alimentación con una cantidad adecuada de sal, una combinación de sales o soluciones de la misma, por ejemplo, una cantidad adecuada de una solución de cloruro de sodio 5 M, hasta alcanzar la conductividad deseada.

Se puede lograr un acondicionamiento que tenga como objetivo reducir el pH de la alimentación complementando la alimentación con una cantidad adecuada de una solución ácida, como una solución de ácido clorhídrico (0,2 M a 1,0 M) o una solución de ácido acético (1 M).

Se puede lograr un acondicionamiento que tenga como objetivo aumentar el pH de la alimentación al suplementar la alimentación con una cantidad adecuada de una solución alcalina, como una solución de hidróxido de sodio (0,2 M a 1,0 M) o una solución base de TRIS 2 M con pH 9,50.

Otros compuestos que pueden usarse para acondicionar la alimentación antes de la etapa de cromatografía multimodal son etanol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol o cualquier otro compuesto conocido en la técnica que estimule aún más la unión selectiva de la proteína de interés a la resina de la cromatografía multimodal.

En algunas modalidades, durante los procesos de purificación de proteínas a gran escala, el alimento a menudo ya se proporciona en condiciones adecuadas para el método divulgado actualmente, pero inadecuado para ser utilizado para métodos de acuerdo con la técnica anterior, por lo que requiere una etapa de acondicionamiento adicional antes de que se pueda realizar una purificación adicional utilizando métodos de la técnica anterior. Por lo tanto, la divulgación actual permite que tales pasos intermedios se eliminen, reduciendo así el número de pasos durante los procesos de producción de proteínas, aumentando así su efectividad y rendimiento.

En algunas modalidades, en preparación para poner en contacto la alimentación con el intercambiador multimodal, es una práctica común en la técnica equilibrar

este último, para lograr condiciones compatibles para la carga de la alimentación y la unión de la proteína de interés al intercambiador.

El equilibrio del intercambiador se puede lograr haciendo fluir un tampón de equilibrio a través del intercambiador para establecer el pH, la conductividad, la concentración de sales, etc. apropiados. En algunas modalidades, el tampón de equilibrio puede incluir cualquiera de una amplia gama de opciones dependiendo de los requisitos de unión de una proteína particular. El tampón de equilibrio normalmente incluirá un compuesto de tampón para conferir un control de pH adecuado. Los compuestos de tampón pueden incluir, entre otros, MES, HEPES, BICINA, imidazol, Tris, fosfato como PBS, citrato o acetato, o alguna mezcla de los tampones anteriores u otros. La concentración de un compuesto de tampón en un tampón de equilibrio comúnmente varía de 20 a 100 mM dependiendo de la proteína de interés. El pH del tampón de equilibrio puede variar de aproximadamente pH 4,0 a pH 9,5, más preferiblemente de 6 a 8. Como se mencionó anteriormente, un pH inferior a 6 generalmente comprometerá la unión, mientras que un pH superior a 9 dará como resultado modificaciones no deseadas de la proteína. El tampón de equilibrio también puede comprender una sal para ajustar la fuerza iónica o la conductividad de la solución según sea necesario. Los ejemplos de sales adecuadas incluyen sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o mezclas de los mismos.

La elución de la proteína de interés del intercambiador multimodal se puede realizar con la ayuda de un tampón de elución. Tanto la elución en gradiente como la elución isocrática pertenecen a las opciones de elución. Durante la elución isocrática, la composición de la fase móvil permanece constante durante todo el procedimiento. Por el contrario, durante la elución en gradiente, la composición de la fase móvil se altera durante el proceso de elución.

Al optar por una elución en gradiente, la elución puede hacerse disminuyendo gradualmente el pH en el tampón de elución o disminuyendo gradualmente la concentración de sal (como NaCl) en el tampón de elución o ambos.

En una modalidad, la elución ocurre disminuyendo gradualmente y escalonadamente el pH de dicho tampón de elución por debajo de 7. En una modalidad adicional, el pH de dicho tampón de elución disminuye gradualmente de un pH 8 a al menos un pH de aproximadamente 5,5 o inferior. En otra modalidad, la elución ocurre disminuyendo gradualmente y escalonadamente la concentración de sal del tampón de elución, a una concentración de sal por debajo de 0,5 M. En una modalidad adicional, dicha concentración de sal pasará de las condiciones de carga usadas tales como 2 M o 1 M a por debajo de 0,5 M (manteniendo la concentración de tampón igual). Preferentemente, se usa una solución de NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o KPO_4 . En una modalidad adicional, la elución se puede lograr disminuyendo tanto el pH como disminuyendo la concentración de sal del tampón de elución conforme a las condiciones descritas anteriormente.

La cantidad de pasos necesarios durante la elución en gradiente y el gradiente de pH, así como el gradiente de sal, dependerán de la naturaleza de la proteína a purificar.

Alternativamente, se usa elución isocrática, en donde dicho tampón de elución tendrá una concentración de sal constante o un pH constante. En una modalidad, dicho tampón de elución tendrá una concentración de sal de entre 5 mM y 500 mM, más preferiblemente 10 mM y 450 mM. Preferentemente, se usa NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o KPO_4 . En otra modalidad, el pH de dicho tampón de elución estará entre aproximadamente 5,5 y 7, tal como 6. Un ejemplo es un tampón MES de pH 6. En una modalidad adicional, se usa una combinación de pH y concentración de sal como se describió anteriormente. para eluir la proteína de interés. Un ejemplo es un tampón MES 50 mM y NaCl 350 mM con un pH 6.

La elución típicamente ocurre en aproximadamente 3 a aproximadamente 20 volúmenes de columna. Después del uso, la resina multimodal puede opcionalmente limpiarse, despojarse, desinfectarse y almacenarse en un agente apropiado y, opcionalmente, reutilizarse. Procedimientos para el despojamiento de la resina incluyen, por ejemplo, el tratamiento de la resina con ácido acético, por ejemplo, entre 50 mM y 150 mM de ácido acético.

Entre la carga/unión de la proteína y la elución, se pueden realizar uno o más pasos de lavado. El lavado puede ser ventajoso para reequilibrar la columna y eliminar las impurezas débilmente unidas antes de la elución. El tampón de lavado es el mismo que el tampón utilizado para equilibrar el intercambiador multimodal o está condicionado para tener un pH y conductividad que dará como resultado la desorción de impurezas débilmente unidas sin la desorción del compuesto objetivo del intercambiador multimodal de cromatografía. El tampón de lavado puede contener, por ejemplo, Tris, HEPES, fosfato, BICINA, trietanolamina MES, cloruro de sodio, fosfato de amonio, sulfato de sodio y / o fosfato de potasio. En algunas modalidades, las condiciones de lavado generalmente varían y deben seleccionarse experimentalmente para cada combinación de resina / proteína de interés.

Cuando el agente de tampón y la sal son el mismo producto químico, se obtiene la ventaja adicional de que la alteración de condiciones tales como la conductividad o la concentración de sal durante la elución se puede realizar sin la necesidad de volver a acondicionar la muestra. Por lo tanto, en una modalidad, el producto químico de tampón utilizado es el mismo que la sal utilizada para conducir la elución de la resina. Por ejemplo, cuando se usa fosfato como agente de tampón, los fosfatos de potasio se usan preferiblemente como sales para llevar a cabo la elución de la resina. Esto da como resultado un proceso de purificación más rápido y eficiente al reducir la cantidad de pasos, así como la cantidad de químicos / tampones requeridos durante el procedimiento de purificación, y eventualmente también reduce los costos del proceso.

La alimentación comprende al menos una proteína de interés tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, enzimas, proteínas recombinantes u otras proteínas expresadas por las células. En una modalidad, la proteína de interés es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-TNF α . En otra modalidad, la proteína de interés es un fragmento de anticuerpo.

En algunas modalidades, los anticuerpos que pueden purificarse según el presente método son anticuerpos que tienen un punto isoeléctrico de 6,0 o superior, preferiblemente 7,0 o superior, más preferiblemente 7,5 o superior. Estos anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas de la clase G, A o M. Los anticuerpos pueden ser humanos, o no humanos (como roedores) o quiméricos (por ejemplo, "humanizados"), o pueden ser subunidades de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, o pueden ser proteínas híbridas que consisten en una parte de inmunoglobulina y una parte derivada de o idéntico a otra proteína (no inmunoglobulina). El material de anticuerpo resultante del método como se describe en el presente documento generalmente tendrá una pureza muy alta (en referencia al contenido de proteína) de al menos 98%, preferiblemente al menos 99%, más preferiblemente al menos 99,9%, incluso lo más preferiblemente al menos 99,99%.

En algunas modalidades, los procesos comerciales a gran escala de producción de proteínas y purificación posterior a menudo pueden comprender etapas de purificación iniciales, etapas de inactivación viral y etapas de purificación finales que a menudo se denominan pulido. Aunque es necesario para lograr un alto nivel de pureza de proteínas, el pulido puede conducir a una pérdida significativa de rendimiento de proteínas, lo que debe evitarse desde un punto de vista comercial. En una modalidad, el método de purificación de proteínas proporcionado por la divulgación actual es el único paso de purificación final realizado durante el proceso de producción y purificación de proteínas. Debido a la eficacia mejorada del método según el método actual, un solo paso de purificación o cromatografía es suficiente para realizar la compleja tarea de los pasos consecutivos de purificación o cromatografía de la técnica anterior. El método actualmente divulgado permite así disminuir el número de pasos necesarios durante los procesos de producción y purificación de proteínas. Una reducción en el número de pasos lleva a una reducción en el equipo necesario para el proceso, el número de consumibles, el tiempo necesario para realizar la purificación y el OPEX, todo sin una reducción en la calidad, pureza o rendimiento de la proteína. Por consiguiente, el método de la divulgación ofrece ventajas irresistibles

para la producción a nivel industrial de proteínas purificadas tales como proteínas recombinantes, más en particular, anticuerpos monoclonales. De acuerdo con esto, y en otra modalidad o modalidades adicionales, el método para la purificación de proteínas como se describe en el presente documento se usa como una etapa de pulido, preferiblemente como una etapa de pulido durante los procesos de producción de proteínas a gran escala. El paso de pulido de la divulgación proporciona un método para obtener un producto de proteína purificada con un grado más alto de pureza sin comprometer el rendimiento del proceso de producción.

En una modalidad, el método para la purificación de proteínas como se describe en el presente documento se usa como un paso de pulido, en el que el paso de pulido está precedido por al menos un paso anterior, dicho paso podría ser un paso de clarificación de una cosecha de cultivo celular o un paso de cromatografía o ambos. Durante un proceso de producción de proteínas, el paso de clarificación realizado en una cosecha de cultivo celular asegura la eliminación de los desechos celulares y otros contaminantes de la cosecha cruda de cultivo celular. La cosecha del cultivo celular se obtiene típicamente cultivando células en un biorreactor. Como resultado de la clarificación, se obtiene una alimentación que comprende la proteína de interés que es adecuada para los pasos de procesamiento aguas abajo. Preferiblemente, el método actual usa una etapa de clarificación de acuerdo con PCT/EP2018/058366 y US62/670,220 cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. De manera breve, el paso de clarificación se basa en la formación de flóculos en la cosecha del cultivo celular, seguido por una remoción eficiente de los flóculos empleando la alimentación resultante que comprende la proteína de interés.

El paso de clarificación del método actual incluye un paso de intercambio aniónico. En una modalidad, el paso de intercambio aniónico es un paso de intercambio aniónico líquido. Este paso de intercambio aniónico líquido se realiza, en una modalidad, mediante la adición de compuestos electropositivos a la cosecha de cultivo celular. Se cree que los compuestos electropositivos se unen a componentes cargados negativamente derivados de las células huésped, tales

como, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos que incluyen ADN y ARN de la célula huésped y virus de la célula huésped. Por consiguiente, una ventaja de incluir un paso de intercambio aniónico durante la clarificación celular es la contribución potencial de los compuestos electropositivos a la reducción de componentes virales en la cosecha del cultivo celular. Los compuestos electropositivos se proporcionan durante la clarificación, ya sea en una fase sólida como unida a perlas o a un filtro de profundidad, o como compuesto adecuados efectuando así un paso líquido de intercambio aniónico.

Los compuestos electropositivos adecuados son cualquier compuesto cargado electropositivo tal como polisacárido electropositivo, polímero electropositivo, quitosano, derivados de quitosano como quitosano desacetilado, polímeros sintéticos como cloruro de polidialildimetilamonio (pDADMAC o poliDDA), poli (alilamina) bencilada y polietilenimina, partículas disponibles comercialmente como TREN (BioWorks, WorkBeads TREN, alto) o tensioactivos catiónicos como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (también conocido como CTAB) o cualquier combinación de los mismos. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que los polímeros electropositivos actúan como agentes de floculación porque pueden unir simultáneamente varios contaminantes cargados negativamente, como el ADN y el ARN de la célula huésped, lo que provoca la formación de un flóculo. Se encontró que los compuestos electropositivos arriba mencionados se desempeñan extremadamente bien (formación de flóculo y tamaño de flóculo) cuando se combinan con filtrado usando DE en concordancia con el método de la divulgación.

En otra modalidad, uno o más compuestos seleccionados del grupo de ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono y derivados de los mismos o ureidos se añaden adicionalmente a la cosecha de cultivo celular durante la etapa (a). Los diferentes compuestos de la etapa (a) pueden mezclarse antes de su adición simultánea al cultivo celular. Esto es ventajoso ya que reduce el número de pasos necesarios para obtener un cultivo celular clarificado. Los compuestos de la etapa (a) también podrían añadirse por separado, secuencialmente y/o alternativamente al cultivo celular.

Los ureidos y los ácidos grasos descritos anteriormente son especialmente adecuados para (adicionalmente) inducir la precipitación y floculación de las impurezas asociadas al cultivo de células huésped en la etapa (a) del método de acuerdo con la descripción. Se cree que los ácidos grasos que tienen de 7 a 10 átomos de carbono, por un lado, ejercen interacciones hidrofóbicas con impurezas derivadas de células huésped hidrofóbicas, causando su aglomeración. Los ácidos grasos adecuados pueden ser ácido enántico (ácido heptanoico), ácido caprílico (ácido octanoico), ácido pelargónico (ácido nonanoico), ácido cáprico (ácido decanoico) o cualquier combinación de los mismos. El ácido graso puede añadirse en forma de un derivado de ácido graso, por ejemplo, una sal de ácido graso, tal como una sal de sodio, por ejemplo, caprilato de sodio. Se cree que los ureidos, por otro lado, funcionan como agentes aglutinantes al interactuar con impurezas en solución, por ejemplo a través de enlaces de hidrógeno. Los ureidos son compuestos orgánicos derivados de la urea y pueden tener una estructura cíclica o acíclica. Los ureidos incluyen, entre otros, alantoína y ácido alantoico.

Los compuestos que se agregan al cultivo celular estimularán la precipitación de impurezas y/o la agregación o aglomeración de impurezas, precipitados o partículas presentes en la cosecha. Específicamente, las fracciones precipitadas contienen impurezas de la célula huésped, por ejemplo, células huésped, proteínas de la célula huésped y ADN de la célula huésped. La floculación de las impurezas de la célula huésped se logra debido a la capacidad de los compuestos añadidos de ejercer interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas y/o enlaces de hidrógeno con las impurezas relacionadas con las células huésped presentes en la cosecha del cultivo celular u otros mecanismos de interacción. Las fracciones precipitadas pueden incluir además componentes virales presentes en las células huésped. La clarificación celular en el paso (a) contribuye a la eliminación viral de la alimentación de múltiples maneras. Primero, Se sabe que los ácidos grasos de cadena media tienen actividad antiviral y se ha demostrado previamente que causan la precipitación de partículas virales. Finalmente, los compuestos electropositivos utilizados en el paso (a) son capaces de unir partículas virales basadas en interacciones electrostáticas con este último. En

consecuencia, el paso (a) contribuye significativamente a la eliminación viral de la alimentación.

Simultáneamente a la adición de los compuestos descritos anteriormente o en una etapa posterior, se agrega DE a la cosecha de cultivo celular y se deja sedimentar como una capa o torta de DE en una superficie, preferiblemente un filtro de soporte que tiene una superficie de filtro (impermeable a DE) en donde la superficie del filtro puede no necesitar ser una superficie horizontal, plana o en forma de disco, pero puede ser, por ejemplo, en forma de vela. Una modalidad de un filtro específico se describe en el documento US62/670.220 que se incorpora en su totalidad como referencia en el presente documento. En resumen, dicho recipiente puede comprender un revestimiento flexible en el que dicho recipiente de filtración incluye al menos un filtro que tiene una superficie sobre la cual el medio de filtro dinámico se acumula en una torta, dicha torta y al menos un filtro adaptado, durante la operación de filtración, le permiten a un filtrado que incluye moléculas objetivo pasar a través de ella y dicha torta, durante la operación de filtración, adaptado para evitar que materiales sólidos no deseados pasen a través del mismo; y una fuente de retrolavado que incluye un fluido de retrolavado y conectada de forma fluida al recipiente de filtración a través del al menos un filtro, dicha fuente de retrolavado, durante la operación de retrolavado, esta adaptada para suministrar fluido de retrolavado a través del al menos un filtro para eliminar la torta formada en el filtro. En una modalidad, dicho recipiente de filtración incluye al menos un filtro de vela que tiene una superficie sobre la cual el medio de filtro dinámico se acumula en una torta, dicha torta y al menos un filtro están adaptados, durante el funcionamiento normal, para permitir que pase un filtrado que incluye moléculas objetivo a través del mismo y dicha torta, durante el funcionamiento normal, adaptado para evitar que los materiales sólidos no deseados pasen a través del mismo, El recipiente de filtración incluye un revestimiento flexible para recibir la solución de recolección de cultivo celular y en comunicación fluida con al menos un filtro de vela. En una modalidad, el recipiente de filtración comprende un recipiente externo rígido o semirrígido para recibir el revestimiento flexible. En una modalidad, está presente un actuador para plegar el

revestimiento flexible. Dicho revestimiento flexible puede incluir un drenaje o un agitador. En una modalidad, al menos un filtro de vela está suspendido dentro del revestimiento flexible.

Tal torta de DE contendrá una estructura que comprende una pluralidad de canales o caminos. Tras la filtración de la cosecha de cultivo celular que comprende los flóculos a través de la capa o torta de DE, la estructura de la torta de DE retiene la materia grande, como las células, los desechos celulares y otros compuestos grandes no objetivo de la solución obtenida). Las proteínas, que tienen un tamaño más pequeño, fluyen a través de los canales de la estructura de la torta de DE. Para facilitar dicho flujo, se usa una bomba u otra ayuda para dispensar presión u otro mecanismo de accionamiento de fluido como se describe adicionalmente en las modalidades a continuación.

El uso de DE para facilitar la filtración supera las limitaciones impuestas por los cambios físicos del cultivo celular después de la floculación, que tienden a hacer compleja la clarificación de rutina. Por ejemplo, en caso de filtración profunda, se necesita una superficie muy significativa de filtros profundos para aclarar la primera solución que comprende los precipitados formados. El uso de DE permite lograr ventajas operativas significativas que incluyen un tiempo de procesamiento más corto, menos pasos de proceso, menos materiales de proceso, menos equipos y soluciones, sin comprometer la calidad del paso de clarificación de la celda. Finalmente, la filtración de la cosecha de cultivo celular floculado da como resultado una alimentación que comprende la proteína de interés.

Una etapa de cromatografía que precede a la etapa de pulido de acuerdo con la modalidad mencionada anteriormente del método de la descripción puede referirse, por ejemplo, a una cromatografía de intercambio iónico líquido realizada como parte del proceso de clarificación. En una modalidad adicional, la etapa de cromatografía que precede a la etapa de pulido puede referirse a una etapa de captura de proteínas basada en una etapa de cromatografía de intercambio iónico o una etapa de cromatografía de afinidad realizada en la cosecha de cultivo celular clarificada antes de la etapa de pulido. En otra u otra modalidad, la alimentación

para el pulido de cromatografía multimodal de acuerdo con la descripción es una fracción de flujo continuo de una etapa de cromatografía o una fracción derivada de la misma. La eliminación de impurezas clave en los pasos que preceden al paso de pulido de acuerdo con la divulgación actual permite un rendimiento mejorado de este último.

Durante un procesamiento de proteína, una alimentación que comprende una proteína de interés y virus se someterá típicamente a un paso o proceso de inactivación de virus. Después de la inactivación del virus, el virus o las partículas virales todavía están presentes en la alimentación y deben eliminarse de manera eficiente, lo que garantiza un alto rendimiento y pureza de las proteínas. La inactivación viral puede haberse logrado en una etapa que precede a la etapa de pulido de acuerdo con la divulgación actual mediante el uso de un pH bajo, inactivando así los virus en la alimentación, en consecuencia, la alimentación puede comprender virus o partículas virales inactivados. Al realizar el método actual para la purificación de proteínas después de la inactivación viral, se obtiene una proteína muy pura con un alto rendimiento.

Los pasos de cromatografía de acuerdo con el método divulgado pueden realizarse en modo por lotes. Alternativamente, dichos pasos de cromatografía se realizan en modo continuo. Cuando se realiza en modo por lotes, dicho paso de cromatografía se repite sobre una columna (lote de una sola columna) o múltiples columnas (lote paralelo) hasta que se haya cargado toda la alimentación y posteriormente se haya eluido. El eluido o los eluidos agrupados, respectivamente, se agrupan opcionalmente antes de proceder al siguiente paso de purificación. Alternativamente, los pasos de cromatografía se pueden realizar como un proceso continuo donde cada paso del método de purificación se realiza simultáneamente y una sola columna o múltiples columnas se cargan y se eluyen continuamente. Si bien la secuencia clásica de operación por lotes no requiere adaptaciones específicas del equipo y a menudo da como resultado una proteína de alta pureza, El método actual es adecuado para realizarse en un proceso de modo continuo de columna paralela. Un modo continuo ofrece las ventajas adicionales de que se puede lograr una productividad más alta ya que la eficiencia

del proceso de purificación de proteína se incrementa. En adición, el modo continuo ayuda a reducir los costos de producción de proteína al reducir la cantidad de consumibles requeridos para una escala de purificación más grande. La cromatografía en modo continuo, por ejemplo, permite reducir el tamaño de la columna de cromatografía sin sacrificar la productividad del paso de purificación.

Se supone que la presente invención no está restringida a ninguna forma de modalidad descrita anteriormente y que se pueden agregar algunas modificaciones sin una nueva evaluación de las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es un diagrama de flujo que muestra una visión general de un proceso comercial a gran escala de producción y purificación de proteínas.

Los procesos comerciales a gran escala de producción de proteínas y purificación posterior a menudo comprenden etapas iniciales de purificación, etapas de inactivación viral y etapas finales de purificación que a menudo se denominan pulido. Aunque es necesario para lograr un alto nivel de pureza de proteínas, el pulido puede conducir a una pérdida significativa de rendimiento de proteínas, lo que debe evitarse desde un punto de vista comercial.

El paso de clarificación **1** se realiza en una cosecha de cultivo celular y asegura la eliminación de los restos celulares y otros contaminantes de la cosecha de cultivo celular cruda. La cosecha del cultivo celular se obtiene típicamente cultivando células en un biorreactor. Como resultado de la clarificación, se obtiene una alimentación que comprende la proteína de interés que es adecuada para los pasos de procesamiento aguas abajo.

Una primera purificación de proteínas **2** que precede a la etapa de pulido de acuerdo con una modalidad del método puede comprender una etapa de captura de proteínas basada en una etapa de cromatografía de intercambio iónico o una etapa de cromatografía de afinidad realizada en la cosecha de cultivo celular clarificada.

Durante un procesamiento de proteína, una alimentación que comprende una proteína de interés y virus se someterá típicamente a una etapa de inactivación de virus **3**. La inactivación viral se puede lograr en una etapa que precede a la etapa de pulido de acuerdo con la divulgación actual mediante el uso de un pH bajo, por inactivando así los virus en la alimentación, en consecuencia, la alimentación puede comprender virus inactivos o partículas virales.

Los métodos de la técnica anterior combinan varios pasos de pulido y un paso intermedio de ultrafiltración o filtración profunda para lograr un alto grado de pureza de la proteína de interés purificada. Cuando el método actual para la purificación de una proteína se usa como el paso de pulido **4**, los múltiples pasos de los métodos de la técnica anterior se reducen a un solo paso, basado en el uso del paso de cromatografía de intercambio iónico multimodal. En la figura 1, el intercambio aniónico se muestra como un ejemplo, pero el experto en la materia comprenderá que el intercambio catiónico pertenece igualmente a las opciones.

El uso de intercambio de iones multimodal da como resultado la reducción del tiempo del proceso de purificación, el espacio y los consumibles sin comprometer el grado de pureza de la proteína al final del proceso de purificación. El paso de pulido **4** conduce a la proteína purificada de interés.

Opcionalmente, el proceso de purificación incluye un paso adicional de filtración viral **5** y un paso de formulación **6**.

La **figura 2** es un diagrama de flujo que representa una visión general del método para purificar una proteína de acuerdo con una modalidad de la divulgación.

La modalidad representada del método descrito para la purificación de una proteína de interés emplea una etapa de cromatografía de intercambio aniónico multimodal. La carga de la alimentación y la unión de la proteína de interés **9** sobre la resina de cromatografía multimodal de acuerdo con esta modalidad se produce a un pH de aproximadamente 7 a 9 y una alta conductividad de al menos 75 mS / cm. Las condiciones de alta conductividad dan como resultado un cambio hacia las propiedades hidrofóbicas del intercambiador multimodal, por lo que la

interacción de la proteína de interés con el intercambiador iónico multimodal se basa en las propiedades hidrofóbicas de dicha proteína y el resto hidrofóbico del ligando de intercambio iónico multimodal. Este cambio permite una modulación exitosa de las propiedades de separación de la resina de cromatografía multimodal, por ejemplo, selectividad hacia la forma monomérica de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo. Además, el cambio en la cromatografía también permite separar selectivamente las variantes de carga de anticuerpos entre sí. Simultáneamente, también se conservan todos los atributos principales de la cromatografía de intercambio aniónico, como la reducción de las proteínas de la célula huésped y el ADN, así como la reducción de las partículas virales. Por lo tanto, el método permite obtener una muestra de proteína altamente pura, de alta calidad.

Las condiciones de la alimentación que comprende la proteína de interés, así como la resina de cromatografía, se ajustan por acondicionamiento **7** y equilibrando **8** hacia las condiciones descritas anteriormente, antes de realizar la etapa de cromatografía multimodal, o ya pueden cumplir las condiciones descritas. El acondicionamiento **7** de la alimentación a una alta conductividad puede realizarse complementando la alimentación con una cantidad adecuada de sal o una combinación de sales.

Después de la carga y la unión **9** de la proteína de interés a la resina de intercambio iónico multimodal, la resina se lava **10** dos veces con 3 a 20 veces el volumen de la columna. Esto permite eliminar contaminantes no unidos y débilmente unidos de la columna.

La proteína purificada se eluye luego de la resina de cromatografía de intercambio multimodal usando elución isocrática o gradiente. En la modalidad actual, la elución isocrática se realiza con un tampón de elución, que tiene una concentración de sal de entre 250 mM y 500 mM y un pH de entre 5,5 y 6,6.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos están destinados a aclarar aún más la divulgación, pero no deben considerarse como una limitación de esta última.

Ejemplo 1: Purificación de un anticuerpo

Se pasó una solución de proteína que contenía un anticuerpo de interés a través de una matriz de cromatografía multimodal, Capto Adhere Impres, GE Lifesciences, en modo de unión-elución usando un sistema de cromatografía AKTA 150. La columna se equilibró con un tampón HEPES 50 mM, NaCl 2 M, pH 7,0. Después de la unión a la matriz de la columna a 30 g/l, la columna se lavó con un tampón HEPES 50 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,0. La proteína de interés se eluyó de la columna mediante elución isocrática con un tampón HEPES 50 mM, NaCl 0,35 M, pH 7,0. Se logra más del 98% de pureza del anticuerpo de interés después de este paso de columna, según lo evaluado por SEC-HPLC.

Ejemplo 2

Para este ejemplo, se usaron aproximadamente 10 ml de anticuerpo de Aadalimumab purificado por afinidad que tiene una concentración de 7 mg/ml procedente de cultivo celular de 10 litros.

El pH de la solución después de la neutralización fue pH 7,0, donde la neutralización se realizó usando una solución de base Tris 2 M que tiene un pH de 9,4. Al usar esta solución, el pH de la proteína eluida por afinidad se elevó de pH 3,5 a pH 7,0. Después de la neutralización, la conductividad de la fracción principal eluida por cromatografía de afinidad fue de 5,4 mS / cm. La fracción principal eluida por cromatografía se reacondicionó usando solución concentrada de NaCl 5 M a una conductividad de aproximadamente 92 mS / cm. Esta concentración de sal coincidía con la conductividad del tampón de unión del mismo. El pH de la solución también se ajustó utilizando 150 µl de NaOH 5 M a pH 7,0.

Después de la etapa de reacondicionamiento, la proteína se cargó en una columna Capto MMC HiScreen (0.8x10 cm) de intercambiador de cationes de modo mixto, con un volumen de lecho de 4.7 ml ajustado al sistema de cromatografía AKTA 150 (GE Lifesciences), a 200 cm/h. Antes de la carga, la columna se equilibró con un tampón KPO₄ 1 M, pH 7,0. La carga se realizó a 14

mg/ml de matriz y 3 minutos de tiempo de residencia, la columna se lavó con el mismo tampón (primer lavado). Después del primer paso de lavado, la proteína se eluyó de la columna con un tampón KPO_4 10 mM, pH 7,0. El cromatograma confirmó un excelente rendimiento de la proteína de interés (ver figura 3). En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos adicionales de modalidades de acuerdo con la divulgación actual.

Tabla 1: Condiciones de cromatografía multimodal según modalidades del método divulgado

	Condiciones A	Condiciones B	Condiciones C
Condiciones de equilibrado y unión	Condiciones de alta conductividad: Hasta NaCl 2M o hasta K_xPO_4 1M Alto pH: Hasta pH 8,5		Condiciones de alta conductividad: Hasta NaCl 2M o hasta K_xPO_4 1M pH neutro
Condiciones de lavado	Lavado 1 – mismas que del equilibrio		
	Lavado 2 Conductividad levemente menor pH sin cambio	Lavado 2 Conductividad levemente menor pH levemente menor	Lavado 2 Conductividad levemente menor pH neutro
Condiciones de elución	Gradiente de elución: Concentración descendiente de la sal a pH constante	Gradiente de elución: Concentración descendiente de la sal a pH descendiente	Elución isocrática: Concentración de la sal significativamente menor a pH constante.

Si bien las modalidades preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en este documento, será obvio para los expertos en la materia que tales modalidades se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se le ocurrirán a los expertos en la materia sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente memoria en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.