

LAVADO CON ARGININA EN LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para aislar un producto y/o reducir impurezas tales como proteínas de la célula hospedadora (HCP, por sus siglas en inglés) de un fluido de carga que comprende el producto y una o más impurezas haciendo pasar el fluido de carga a través de una columna cromatográfica, seguido de al menos una solución de lavado que comprende arginina o un derivado de arginina, p. ej., una sal de arginina en una concentración superior a 525 mM y un pH superior a 8, y recoger el producto usando una solución de elución.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la purificación de proteínas y, en particular, a métodos para purificar una proteína unida a una resina cromatográfica haciendo pasar al menos una solución de lavado que contiene arginina o un derivado de arginina o una sal de arginina a través de la columna cromatográfica que contiene dicha resina y recogiendo posteriormente la proteína purificada en el eluato.

Mediante el uso de tecnología recombinante, muchas proteínas, tales como los anticuerpos terapéuticos, se cultivan en líneas celulares hospedadoras eucariotas o procariotas modificadas para expresar la proteína. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas generalmente depende de poder recuperar de manera fiable niveles adecuados de la proteína a partir de impurezas tales como proteínas de la célula hospedadora, variantes de proteínas y compuestos del medio de cultivo.

Los métodos convencionales de purificación de proteínas están diseñados para separar la proteína de interés de las impurezas en función de diferencias de tamaño, carga, solubilidad y grado de hidrofobicidad. Tales métodos incluyen métodos cromatográficos tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y cromatografía en hidroxipatita. Estos métodos suelen emplear una resina cromatográfica que puede diseñarse para adherir selectivamente la proteína de interés o las impurezas. En el modo de unión-elución, la proteína deseada se une selectivamente a la resina cromatográfica y es eluida diferencialmente del medio mediante diferentes disolventes. En el modo de flujo continuo, las impurezas se unen específicamente a la resina cromatográfica mientras que la proteína de interés no lo hace, lo que permite así la recuperación de la proteína deseada en el "flujo que atraviesa la columna".

Los métodos actuales para la purificación de proteínas, tales como los anticuerpos, incluyen dos o más pasos cromatográficos. Por ejemplo, el primer paso en el protocolo de purificación de proteínas puede conllevar un paso de cromatografía por afinidad que utiliza una interacción específica entre la proteína de interés y una resina inmovilizada. No solo las columnas cromatográficas específicas utilizadas influyen en la reducción de las impurezas, sino también las condiciones de lavado y elución. Los inventores de la presente invención han descubierto que ciertas concentraciones de arginina (o sales de arginina o derivados de arginina) y diferentes niveles de pH utilizados en los pasos de lavado de un método cromatográfico dan como resultado, sorprendentemente, una pureza alta y cantidades bajas de proteínas de la célula huésped, en particular cuando se aplican a los anticuerpos nombrados en el presente

documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para reducir impurezas en un eluato que comprende un producto, comprendiendo el método:

5 (a) proporcionar un fluido de carga que comprende un producto y una o más impurezas, en donde el producto es un anticuerpo monoclonal que contiene Fc,

(b) aplicar el fluido de carga en a) a una columna cromatográfica de Proteína A en condiciones adecuadas para que haya unión con el producto,

10 (c) opcionalmente poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A con una primera solución de lavado,

(d) aplicar una o más soluciones de lavado (tales como 1, 2 o 3 soluciones de lavado) a la columna cromatográfica de Proteína A, en donde la solución de lavado comprende arginina o una sal de arginina u otro derivado de arginina en una concentración superior a 500 mM, y en donde el pH de la solución de lavado es superior a 8.0,

15 (e) opcionalmente poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A de d) con otra segunda solución de lavado,

(f) poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A lavada de d) o e) con una solución de elución en condiciones adecuadas para eluir el producto, y

(g) recoger un eluato que comprende el producto.

20 La invención se refiere a la purificación de anticuerpos, y en particular de anticuerpos monoclonales que se unen al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés), al polipéptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP, por sus siglas en inglés) y a la hormona adrenocorticotrófica (ACTH, por sus siglas en inglés), tales como los anticuerpos denominados Eptinezumab, PACAP-1 y ACTH-1 en el presente documento más adelante.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La **Figura 1** muestra un diagrama que representa los resultados de experimentos que analizan el contenido de HCP ("proteínas de la célula hospedadora") en una muestra después de un paso de columna con Proteína A usando una variación en las concentraciones de arginina y las condiciones de pH descritas en el Ejemplo 1.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona métodos para purificar y recuperar un producto de un fluido de carga que contiene una o más impurezas usando un método de purificación que incluye un lavado con arginina o un lavado con una sal de arginina o un derivado de arginina. La invención se puede aplicar a la preparación a gran escala de proteínas con fines terapéuticos y/o de diagnóstico.

35 Para que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen ciertos términos tal como se utilizan en el presente documento. A lo largo de la descripción detallada se establecen definiciones adicionales.

El término "derivado de arginina" o "sal de arginina" en el presente documento se refiere a un derivado resultante de la reacción de la arginina en el grupo amino, el grupo carboxi o el grupo guanidilo,

o de la sustitución de cualquier hidrógeno de la arginina por un heteroátomo, y sales de esta que incluyen ácidos inorgánicos y/u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nitroso, ácido sulfúrico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido piroglutámico, ácido salicílico, ácido salicílico, sacarina y ácidos sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido bencenosulfónico. En algunas modalidades, el término "derivado de arginina" o "sal de arginina" en el presente documento se refiere a e incluye específicamente Arg·HCl, acetilarginina, agmatina, ácido argínico, *N*-alfa-butirol-L-arginina o *N*-alfa-pivaloilarginina.

El término "producto" se refiere a una molécula producida mediante un proceso natural (p. ej., mediante expresión en una célula de mamífero como una célula CHO). El término "producto" incluye una proteína, p. ej., una proteína terapéutica, y en particular anticuerpos monoclonales capaces de unirse a una resina de proteína A a través de su dominio Fc, tales como los anticuerpos denominados Eptinezumab, PACAP-1 y ACTH-1 en el presente documento. Los términos "producto" y "proteína de interés" se utilizan indistintamente.

El término "medio de cultivo condicionado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al sobrenadante que se genera a partir de la eliminación de células y residuos celulares mediante un método de separación, tal como centrifugación y/o microfiltración, a partir del medio de cultivo celular que ha sido expuesto a células hospedadoras, que pueden secretar productos deseados. Nutrientes seleccionados condicionados (p. ej., vitaminas, aminoácidos, cofactores y minerales); factores de crecimiento/suplementos adicionales, incluida la insulina; y proteínas e impurezas adicionales exógenas o proteínas de la célula hospedadora. El término medio de cultivo condicionado incluye medio condicionado clarificado, medio condicionado filtrado y medio de cultivo celular condicionado.

El término "fluido de carga" se refiere a un líquido que contiene el producto que se va a aislar y una o más impurezas. Un fluido de carga entra en contacto con una resina cromatográfica (p. ej., se hace pasar a través de una columna cromatográfica) en las condiciones operativas de la invención que se describen más adelante.

El término "impureza" se refiere a cualquier molécula exógena o indeseable que esté presente en una solución tal como un fluido de carga. Una impureza puede ser una macromolécula biológica tal como ADN, ARN o una proteína, distinta de la proteína de interés que se está purificando, que también está presente en una muestra de la proteína de interés que se está purificando. Las impurezas incluyen, por ejemplo, variantes de proteínas indeseables, tales como proteínas agregadas, proteínas mal plegadas, especies de alto peso molecular, especies y fragmentos de bajo peso molecular y especies desamidadas; otras proteínas de células hospedadoras que secretan la proteína que se está purificando, ADN de la célula hospedadora, componentes del medio de cultivo celular, moléculas que forman parte de un absorbente usado para cromatografía por afinidad que se filtran en una muestra durante los pasos de purificación anteriores, por ejemplo, Proteína A; una endotoxina; un ácido nucleico; un virus, o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

El término "resina" se refiere a una matriz o resina de afinidad que puede experimentar una

interacción ligando-biomacromolécula con un producto que se va a aislar durante un proceso de separación macromolecular. La resina es preferentemente un ligando de tipo proteína A en una columna cromatográfica de proteína A.

El término "proteínas de la célula hospedadora (HCP)" se refiere a proteínas que no son el producto producidas por una célula hospedadora durante el cultivo celular o la fermentación. Por consiguiente, en algunas modalidades, un eluato que contiene un producto tiene HCP presentes en menos de 100 partes por millón (ppm) de HCP (p. ej., menos de aproximadamente 50 ppm o menos de aproximadamente 20 ppm). La composición de HCP es extremadamente heterogénea y depende del producto proteico y del procedimiento de purificación utilizado. Antes de cualquier aprobación de comercialización de un producto biológico para uso terapéutico, el nivel de proteínas contaminantes (tales como HCP) en el producto debe medirse cuantitativamente de acuerdo con las pautas de la ICH y la FDA.

El término "proteína" tal como se usa en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que pueden funcionar como una unidad. El término "polipéptido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Una proteína terapéutica puede ser, por ejemplo, una proteína secretada. Las proteínas terapéuticas incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, algunos de los cuales se describen con más detalle en el presente documento más adelante.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina y abarca cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno. El término incluye, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados *in vitro*.

En modalidades adicionales de la invención, el producto es un anticuerpo que tiene una región CH2/CH3 y, por lo tanto, es susceptible de purificación mediante cromatografía con Proteína A. El término "región CH2/CH3" se refiere a aquellos residuos aminoacídicos en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la Proteína A. En particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que contiene Fc capaz de unirse a un ligando de tipo proteína A.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que contienen Fc de la invención incluyen los anticuerpos descritos más adelante que se unen al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), al polipéptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP) y a la hormona adrenocorticotrófica (ACTH).

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) se produce como un neuropéptido multifuncional de 37 aminoácidos de longitud. Dos formas de CGRP, las formas CGRP-alfa y CGRP-beta, existen en seres humanos y tienen actividades similares. CGRP-alfa y CGRP-beta difieren en tres aminoácidos en seres humanos, y proceden de genes diferentes. La familia de péptidos CGRP incluye amilina, adrenomedulina y calcitonina, aunque cada uno tiene receptores y actividades biológicas distintos. Doods, H., *Curr. Op. Invest. Drugs*, 2(9):1261-68 (2001).

Las migrañas son trastornos neurovasculares que afectan aproximadamente a un 10 % de la población adulta en los EE. UU., y normalmente están acompañadas por cefaleas fuertes. Aproximadamente un 20-30 % de quienes padecen migrañas experimentan aura, que comprende

fenómenos neurológicos focales que preceden y/o acompañan el acontecimiento. Se cree que CGRP desempeña un papel prominente en el desarrollo de las migrañas. Por ejemplo, se identificaron concentraciones plasmáticas elevadas de CGRP en sangre venosa yugular durante la fase de cefalea de las migrañas, hasta llegar a la exclusión de otros neuropéptidos. Además, según Arulmozhi *et al.*, (2005) se ha identificado lo siguiente en quienes padecen migrañas: (1) una marcada correlación entre concentraciones plasmáticas de CGRP y las migrañas; (2) la infusión de CGRP produjo una cefalea de tipo migraña; (3) los niveles de CGRP iniciales fueron elevados; y (4) los cambios en los niveles de CGRP plasmáticos durante los ataques de migraña se correlacionaron significativamente con la intensidad de la cefalea. (Arulmozhi, D.K., et al., *Vas. Pharma.*, 43: 176-187 (2005)).

En determinadas realizaciones, la invención se refiere al anticuerpo de unión a CGRP Eptinezumab con las siguientes secuencias

CDR de cadena pesada para Eptinezumab

CDR-H1: GYYMN **SEQ ID NO: 1**

CDR-H2: VINGATYYASWAKG **SEQ ID NO: 2**

CDR-H3: GDI **SEQ ID NO: 3**

La cadena pesada variable de Eptinezumab comprende

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNWVRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLQMNSLRRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS **SEQ ID NO: 4**

La cadena pesada de Eptinezumab comprende

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGIDLS GYYMNWVRQA PGKGLEWVGV
 IINGATYYA SWAKGRFTIS RDNSKTTVYL QMNSLRRAEDT AVYFCARGDI
 WGQGLTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVT
 VSWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
 SNTKVDARVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY ASTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **SEQ ID NO: 5**

Puede estar presente una lisina (K) C-terminal en caso de que la cadena pesada no se procese en un sistema que la escinda, p. ej., en una levadura tal como *Pichia*, pero la lisina c-terminal generalmente se escindirá en un sistema de expresión de CHO:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGIDLS GYYMNWVRQA PGKGLEWVGV
 IINGATYYA SWAKGRFTIS RDNSKTTVYL QMNSLRRAEDT AVYFCARGDI
 WGQGLTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVT
 VSWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
 SNTKVDARVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY ASTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL

YSKLTVDKSR WQQGNVFS CS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK **SEQ ID NO: 6**

CDR de cadena ligera para Eptinezumab

CDR-L1: QASQSVYHNTYLA **SEQ ID NO: 7**

CDR-L2: DASTLAS **SEQ ID NO: 8**

5 CDR-L3: LGSYDCTNGDCFV **SEQ ID NO: 9**

La cadena ligera variable de Eptinezumab comprende

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLA WYQQKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSRFS
GSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR **SEQ ID NO: 10**

La cadena ligera de Eptinezumab comprende

10 QVLTQSPSSL SASVGDRVTI NCQASQSVYH NTYLA WYQQK PGKVPKQLIY
DASTLASGVP SRFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDVATYYCL GSYDCTNGDC
FVFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC **SEQ ID NO: 11**

15 El polipéptido hipofisario activador de adenilato ciclasa ("PACAP") es un miembro de la familia de secretina/péptido intestinal vasoactivo ("VIP", por sus siglas en inglés)/hormona liberadora de la hormona del crecimiento ("GHRH", por sus siglas en inglés). PACAP es un péptido vasodilatador multifuncional que existe en dos formas activas α -amidadas, una con 38 aminoácidos y la otra con 27 aminoácidos. Ambos péptidos tienen los mismos 27 aminoácidos N-terminales y se sintetizan a partir de la misma proteína precursora, preproPACAP (véase, Moody *et al.*, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 18(1):61-67, 2011). PACAP38 es la forma activa más prevalente y representa hasta un 90 % de las formas de PACAP en tejidos de mamíferos (véase, Kaiser y Russo, *Neuropeptides*, 47:451-461, 2013). La secuencia de PACAP38 es idéntica en todos los mamíferos y difiere de los ortólogos en aves y anfibios en solo un aminoácido (véase, Vaudry *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 52:269-324, 2000). La familia de secretina/VIP/GHRH incluye el péptido histidina metionina ("PHM") de mamíferos, secretina, glucagón, péptido similar al glucagón 1 ("GLP1"), péptido similar al glucagón 2 ("GLP2"), polipéptido insulínico dependiente de glucosa ("GIP") y factor liberador de la hormona del crecimiento ("GRF"). PACAP27 tiene una identidad secuencial de un 68 % con respecto a VIP a nivel de aminoácidos (véase, Vaudry *et al.*, 2000).

30 Se plantea la hipótesis de que PACAP desempeña una función en multitud de enfermedades y trastornos, incluidos, entre otros, migraña, cefalea y dolor, aunque esa función de PACAP no se ha demostrado clínicamente. Se cree que las migrañas tienen un componente neurovascular. Las migrañas afectan aproximadamente a un 10 % de la población adulta en los EE. UU., y normalmente están acompañadas por cefaleas fuertes. Aproximadamente un 20-30 % de quienes padecen migrañas experimentan aura, que comprende fenómenos neurológicos focales que preceden y/o acompañan el acontecimiento. Varias observaciones han sugerido una función de PACAP en la migraña: (1) los niveles plasmáticos de PACAP están elevados durante los ataques de migraña (crisis), en comparación con los niveles entre crisis, en seres humanos (véase Tuka *et al.*, *Cephalalgia*, 33(13):1085-1095, 2013); (2) una infusión de PACAP38 desencadenó cefaleas en sujetos sanos y cefaleas seguidas de ataques similares a los de la migraña en personas con migraña (véanse Schytz *et al.*, *Brain*, 132:16-25, 2009; y Amin *et al.*,

Brain, 137:779-794, 2014, respectivamente); (3) la vasodilatación inducida por PACAP puede desempeñar una función en la inflamación neurógena (véase Kaiser y Russo, *Neuropeptides*, 47:451-461, 2013); y (4) las migrañas inducidas por PACAP se asocian con fotofobia, fonofobia, náuseas y responden a los triptanos (véase Amin *et al.*, *Brain*, 32:140-149, 2012). También se ha mostrado que PACAP induce vasodilatación, 5 fotofobia, así como desgranulación de mastocitos y activación neuronal (véanse, Markovics *et al.*, *Neurobiology of Disease*, 45:633-644, 2012; Baun *et al.*, *Cephalalgia*, 32(4):337-345, 2012; Chan *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics*, 129:332-351, 2011).

En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo que se une a PACAP (denominado PACAP-1) con las siguientes secuencias

10 CDR de cadena pesada para PACAP-1

CDR-H1: SYMT **SEQ ID NO:12**

CDR-H2: FIDAGGDAYYASWAKG **SEQ ID NO:13**

CDR-H3: DLDL **SEQ ID NO:14**

La cadena pesada variable de PACAP-1 comprende

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSYMTWVRQAPGKGLEWIGFIDAGGDAYYA
SWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLDLWGQGTLLTVSS **SEQ ID NO: 15**

La cadena pesada de PACAP-1 comprende

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSYMTWVRQAPGKGLEWIGFIDAGGDAYYA
SWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLDLWGQGTLLTVSSASTKGPSV
20 FPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
25 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**SEQ ID NO: 16**

CDR de cadena ligera de PACAP-1

CDR-L1: QSSSVYGNLYA **SEQ ID NO: 17**

CDR-L2: EASKLES **SEQ ID NO: 18**

CDR-L3: AGGDISEGVA **SEQ ID NO: 19**

30 La cadena ligera variable de PACAP-1 comprende

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSSVYGNLYLAWFQQKPGKAPKFLIYEASKLESGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCAGGDISEGVAFGGGTKVEIKR**SEQ ID NO: 20**

La cadena ligera de PACAP-1 comprende

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSSVYGNLYLAWFQQKPGKAPKFLIYEASKLESGVP
35 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCAGGDISEGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **SEQ ID NO: 21**

Se cree que los péptidos POMC, incluida la ACTH (hormona adrenocorticotrófica), actúan principalmente a través de receptores de melanocortina (MCR, por sus siglas en inglés), una familia de

cinco receptores acoplados a proteína G (es decir, MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R). Los MCR se expresan en diversos tejidos y cumplen funciones fisiológicas discretas. MC1R, que se expresa en melanocitos, macrófagos y adipocitos, participa en la pigmentación y la inflamación. MC2R, que se expresa en la corteza suprarrenal, participa en la esteroidogénesis suprarrenal. MC3R, que se expresa en el sistema nervioso central (SNC), el tubo gastrointestinal (GI) y el riñón, participa en la homeostasis energética y la inflamación. MC4R, que se expresa en el SNC y la médula espinal, participa en la homeostasis energética, la regulación del apetito y la función eréctil. MC5R, que se expresa en linfocitos y células exocrinas, participa en la función exocrina y la regulación de las glándulas sebáceas. Véase Ramachandrapappa *et al.*, *Frontiers in Endocrinology* 4: 19 (2013).

La ACTH, uno de los principales productos finales del procesamiento de POMC, es una hormona que es esencial para la esteroidogénesis normal y el mantenimiento del peso suprarrenal normal. La ACTH es secretada por la hipófisis en respuesta al estrés fisiológico o psicológico y su efecto principal es el aumento de la producción y liberación de corticosteroides. En particular, la ACTH se secreta a partir de corticotropos en el lóbulo anterior (o adenohipófisis) de la hipófisis en respuesta a la liberación de la hormona liberadora de hormona corticotropina (CH, por sus siglas en inglés) por el hipotálamo. Una vez secretada, la ACTH viaja entonces a la corteza suprarrenal, donde se une a MC2R y lo activa. La activación de MC2R da como resultado la producción de AMPc en la célula suprarrenal. El AMPc se une y activa la proteína cinasa (PICA), que activa la conversión del colesterol lipídico en la hormona esteroide cortisol.

El cortisol es una hormona que afecta a numerosos procesos biológicos con el fin de restablecer la homeostasis después del estrés. Los procesos ejemplares regulados por el cortisol incluyen la regulación de la homeostasis de la glucosa, el aumento de la presión arterial, la gluconeogénesis, la estimulación del metabolismo del glucógeno, los lípidos y las proteínas y la supresión del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas normales, los niveles de cortisol están estrictamente regulados. Sin embargo, en algunas afecciones (incluidas las enfermedades y trastornos que se describen con más detalle en el presente documento), los niveles de cortisol están elevados. Se ha mostrado que la sobreproducción de cortisol tiene muchos efectos negativos, como dañar el hipocampo, una región del cerebro que es crucial para las funciones cognitivas y la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal; aumentar los depósitos de grasa, los niveles de tensión arterial y los niveles de azúcar en sangre; pérdida de hueso; debilidad muscular; y supresión del sistema inmunitario. Por lo tanto, los niveles elevados de cortisol pueden desempeñar una función en el hipercortisolismo impulsado por ACTH (tal como la enfermedad de Cushing o el síndrome de Cushing), la obesidad, la diabetes, la apnea del sueño, la depresión, los trastornos de ansiedad, el cáncer (tal como el síndrome de Cushing resultante de la expresión ectópica de ACTH, p. ej., en cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés), carcinoma de páncreas, tumores neurales o timoma), atrofas musculares, hipertensión, disfunción cognitiva, galactorrea y síndromes metabólicos.

La aldosterona es una hormona liberada por las glándulas suprarrenales que ayuda a regular la tensión arterial. En particular, la aldosterona aumenta la reabsorción de sodio y agua y la liberación de potasio en los riñones. En algunas enfermedades, los niveles de aldosterona están elevados. Por ejemplo, el hiperaldosteronismo primario y secundario ocurre cuando la glándula suprarrenal libera demasiada

hormona aldosterona. El hiperaldosteronismo primario, tal como el síndrome de Conn, es resultado de un problema con la propia glándula suprarrenal que provoca la liberación de demasiada aldosterona, mientras que el exceso de aldosterona en el hiperaldosteronismo secundario está provocado por algo fuera de la glándula suprarrenal que imita la afección primaria, p. ej., y provoca que la glándula suprarrenal libere demasiada aldosterona. El hiperaldosteronismo primario solía considerarse una afección rara, pero algunos expertos creen que puede ser la causa de la tensión arterial alta en algunos pacientes. La mayoría de los casos de hiperaldosteronismo primario

En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un anticuerpo que se une a ACTH (denominado ACTH-1) con las siguientes secuencias

CDR de cadena pesada para ACTH-1

CDR-H1: SGYDIC **SEQ ID NO: 22**

CDR-H2: CIDTGSGNTYYASSAKG **SEQ ID NO: 23**

CDR-H3: GISSI **SEQ ID NO: 24**

La cadena pesada variable de ACTH-1 comprende

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSGYDICWVRQAPGKGLEWIGCIDTGSGNTY
YASSAKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGISSIWGQGTLVTVSS **SEQ ID NO:**

25

La cadena pesada de ACTH-1 comprende

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSGYDICWVRQAPGKGLEWIGCIDTGSGNTY
YASSAKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGISSIWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG **SEQ ID NO: 26**

La cadena pesada de ACTH-1 puede comprender una lisina (K) terminal si se expresa en levaduras (p. ej., células de *Pichia pastoris*).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSGYDICWVRQAPGKGLEWIGCIDTGSGNTY
YASSAKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGISSIWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK **SEQ ID NO: 32**

CDR de cadena ligera para ACTH-1

CDR-L1: QASQTISDLA **SEQ ID NO: 27**

CDR-L2: AASKLTS **SEQ ID NO: 28**

CDR-L3: QTYDYDIIDDGAT **SEQ ID NO: 29**

La cadena ligera variable de ACTH-1 comprende

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQTISDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASKLTSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQTYDYDIIDDGATFGGGTKVEIKR **SEQ ID NO: 30**

5 La cadena ligera de ACTH-1 comprende

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQTISDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASKLTSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQTYDYDIIDDGATFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS
TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC **SEQ ID NO: 31**

10 Los preparados de anticuerpos utilizados con los métodos descritos en el presente documento pueden provenir de varias fuentes que incluyen, entre otras, suero de un animal inmunizado, líquido ascítico, sobrenadantes de hibridoma o mieloma, medio de cultivo condicionado derivado del cultivo de una línea celular recombinante que expresa la molécula de anticuerpo, o de un extracto celular de células productoras de anticuerpos. En una modalidad de la invención, el producto es un anticuerpo procedente

15 de un medio de cultivo condicionado de una línea celular recombinante productora de anticuerpos. Aunque puede haber alguna variación de una línea celular a otra y entre los diversos productos de anticuerpos, según la divulgación del presente documento, está dentro de las competencias de un experto ordinario en la técnica adaptar la invención del presente documento a una combinación particular de proteína de anticuerpo y línea celular productora.

20 En ciertas realizaciones, al menos una impureza está en la carga de fluido aplicada a la columna cromatográfica, y al menos una solución de lavado que contiene arginina o una sal de arginina o un derivado de arginina se usa para eliminar la impureza que está unida a la resina de dicha columna cromatográfica. En una modalidad de la invención, el producto purificado contiene menos de un 60 % de impurezas (p. ej., proteínas de la célula hospedadora), en una modalidad aproximadamente un 40 % de impurezas, en una

25 modalidad aproximadamente un 20 % de impurezas, en una modalidad aproximadamente un 10 % de impurezas, en una modalidad aproximadamente un 5 % de impurezas, en una modalidad menos de un 3 % de impurezas y en otra modalidad menos de un 1 % de impurezas después del lavado y elución de la columna cromatográfica. Las impurezas incluyen, entre otras, variantes de proteínas indeseables, tales como proteínas agregadas, especies de alto peso molecular, especies y fragmentos de bajo peso molecular

30 y especies desamidadas; otras proteínas de células hospedadoras que secretan la proteína que se está purificando, ADN de la célula hospedadora, componentes del medio de cultivo celular, moléculas que forman parte de un absorbente usado para cromatografía por afinidad que se filtran en una muestra durante los pasos de purificación anteriores, por ejemplo, Proteína A y Proteína G; una endotoxina; un ácido nucleico; un virus, o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

35 La columna cromatográfica usada en un método descrito en el presente documento es, por ejemplo, una columna cromatográfica de afinidad, una columna cromatográfica de interacción hidrófoba, una columna cromatográfica de afinidad por metales inmovilizados, una columna cromatográfica de exclusión por tamaño, una diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral y/o columna cromatográfica de intercambio iónico, una columna cromatográfica de proteína A o una columna

cromatográfica de Proteína G. Una columna cromatográfica de Proteína A puede ser, por ejemplo, PROSEP-A™ (Millipore, Reino Unido), Protein A Sepharose FAST FLOW™ (GE Healthcare, Piscataway, N.J.), TOYOPEARL™ 650M Protein A (TosoHass Co., Filadelfia, Pa.), o columna MabSelect™ (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) o MabSelect SuRe (AKTA Avant).

5 Antes de poner en contacto la resina en una columna cromatográfica con un fluido de carga, puede ser necesario ajustar parámetros tales como el pH, la fuerza iónica y la temperatura y, en algunos casos, la adición de sustancias de diferentes tipos. Por lo tanto, es un paso opcional equilibrar la columna cromatográfica lavándola con una solución (p. ej., un tampón para ajustar el pH, la fuerza iónica, etc., o para introducir un detergente) que aporta las características necesarias para la unión y purificación del
10 producto.

 En una modalidad de la invención, se equilibra una columna cromatográfica de Proteína A y se lava con una solución de lavado, para aportar así las características necesarias para purificar el producto. En una modalidad de la invención, la columna cromatográfica de Proteína A se puede equilibrar usando una solución que contiene una sal, p. ej., NaPO₄ de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, y
15 NaCl de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM. El pH del tampón de equilibrio puede estar comprendido entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.0. En una realización, el pH del tampón de equilibrio es aproximadamente 6.8. Después de poner en contacto la resina en una columna cromatográfica (p. ej., una columna cromatográfica de Proteína A) con el fluido de carga, se lava en primer lugar la resina. De acuerdo con una modalidad de la invención, puede realizarse un primer lavado con la
20 solución de equilibrio mencionada anteriormente.

 De acuerdo con la invención, tras el equilibrio de la columna cromatográfica de Proteína A, y opcionalmente un primer lavado sin arginina o sal de arginina o derivado de arginina, una solución de lavado posterior utilizada en el método descrito en el presente documento puede contener arginina o un derivado de arginina. El derivado de arginina puede ser, entre otros, acetilarginina, agrnatina, ácido
25 argínico, *N*-alfa-butirol-L-arginina o *N*-alfa-pivaloilarginina.

 La concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado está entre aproximadamente 500 mM y aproximadamente 600 mM, p. ej., 500 mM, 525 mM, 550 mM, 575 mM o 600 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado está entre aproximadamente 500 mM y aproximadamente 600 mM o aproximadamente 525 mM y
30 aproximadamente 575 mM, o aproximadamente 550 mM y aproximadamente 575 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de arginina o derivado de arginina en la solución de lavado es mayor que aproximadamente 500 mM y menor que aproximadamente 600 mM.

 El pH de la solución de lavado está generalmente entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 8.7, por ejemplo, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6 y 8.7. En algunos casos, el pH de la solución de lavado es mayor
35 que 8.0 y menos que aproximadamente 8.7. La solución de lavado puede contener fosfato de sodio de 20 mM a 50 mM (Na₂HPO₄) (p. ej., 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM). En una realización, el medio unido se lava con 5 volúmenes de columna de la solución de lavado, seguido de un paso de elución.

 El paso de lavado con arginina o derivado de arginina puede ir seguida posteriormente de uno o más pasos de lavado sin arginina o derivado de arginina. De acuerdo con una realización, esto puede ser

usar un medio de lavado que contiene acetato de sodio (p. ej., con una concentración de acetato de sodio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, tal como 20 mM, 30 mM, 40 mM o 50 mM) a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 (p. ej., pH de aproximadamente 5.4)

En determinadas modalidades de la invención, el producto se puede eluir a partir de una resina lavada de, p. ej., una columna cromatográfica de Proteína A. Para eluir un producto de una columna cromatográfica de Proteína A, la resina lavada de dicha columna cromatográfica se pone en contacto con un tampón de elución. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene ácido acético de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM. En modalidades adicionales, el tampón de elución también puede contener glicina de 20 mM a 50 mM. El pH del tampón de elución puede estar comprendido entre aproximadamente 2.0 y aproximadamente 5.0. En una realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente 4.0. En otra realización, el pH del tampón es aproximadamente 3.65 o entre 3.55 y 3.57.

Opcionalmente, la resina de la columna cromatográfica se puede limpiar, es decir, se realiza una eliminación de componentes no deseados y se regenera, después de la elución del anticuerpo. Este procedimiento normalmente se realiza regularmente para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

Los componentes del tampón se pueden ajustar según el conocimiento del experto ordinario en la técnica. Los intervalos de composición del tampón de muestra se proporcionan en los Ejemplos más adelante. No todos los tampones o pasos son necesarios, pero se proporcionan solo con fines ilustrativos. Puede usarse una matriz de gran capacidad (*high throughput screen*), como se describe en los Ejemplos, para optimizar eficazmente las condiciones del tampón para la cromatografía en columna de Proteína A.

El eluato puede incluir un producto y la proporción del producto con respecto a la proteína de la célula hospedadora aumenta en comparación con un método correspondiente en el que no se usa ninguna cantidad detectable de arginina o derivado de arginina en una solución de lavado.

La presente invención también se refiere a un producto preparado de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En general, normalmente será deseable aislar y/o purificar adicionalmente productos aislados de acuerdo con la presente invención y formularlos para uso farmacéutico de acuerdo con métodos estándar. Para las proteínas, véanse, por ejemplo, Protein Purification Principles and Practice, 2.^a edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S. J. y Hames, B. D. (eds.) y Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, vol. 182), Academic Press, 1997, incorporados al presente como referencia. Un experto ordinario en la técnica apreciará que las técnicas exactas utilizadas variarán dependiendo del carácter del producto. Los productos de la invención que tienen actividad farmacológica serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Estos pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse primero para su suministro por cualquier vía disponible que incluye, entre otras, parenteral (p. ej., intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal.

Se formula una composición farmacéutica del producto para que sea compatible con su vía de administración prevista de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, Remington:

The Science & Practice of Pharmacy”, 19.^a ed., Williams & Williams, (1995), y “Physician's Desk Reference”, 52.^a ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). En algunas realizaciones, el producto se formula usando agua estéril (p. ej., SWFI), solución salina tamponada (p. ej., solución salina tamponada con fosfato), poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) o mezclas adecuadas de estos.

5 [0087] Los ejemplos no limitantes de productos que pueden recuperarse usando los métodos descritos en el presente documento incluyen una proteína o un péptido, p. ej., un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína recombinante, una proteína secretada de manera natural, una proteína o un péptido que está diseñado para ser secretado, un producto no proteico que es producido por una célula, o una combinación de los productos anteriores.

10

REALIZACIONES

La presente invención se refiere además a las siguientes modalidades (M)

M1. Un método para reducir impurezas en un eluato que comprende un producto, comprendiendo el método:

15

(a) proporcionar un fluido de carga que comprende un producto y una o más impurezas, en donde el producto es un anticuerpo monoclonal que contiene Fc,

(b) aplicar el fluido de carga en a) a una columna cromatográfica de Proteína A en condiciones adecuadas para que haya unión con el producto,

(c) opcionalmente poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A con una primera solución de lavado,

20

(d) aplicar una o más soluciones de lavado (tales como 1, 2 o 3 soluciones de lavado) a la columna cromatográfica de Proteína A, en donde la solución de lavado comprende arginina o una sal de arginina u otro derivado de arginina en una concentración superior a 500 mM, y en donde el pH de la solución de lavado es superior a 8.0,

25

(e) opcionalmente poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A de d) con otra segunda solución de lavado,

(f) poner en contacto la columna cromatográfica de Proteína A lavada de d) o e) con una solución de elución en condiciones adecuadas para eluir el producto, y

(g) recoger un eluato que comprende el producto.

30

M2. El método de la Modalidad 1, en donde el fluido de carga en el paso (a) se obtiene de una célula CHO que expresa Eptinezumab, PACAP-1 o ACTH-1, tal como el medio de cultivo condicionado de las células CHO que expresan dichos anticuerpos.

M3. El método de la Modalidad 1, en donde las impurezas del paso (a) se seleccionan del grupo que comprende ADN, ARN, endotoxinas, proteínas (distintas de Eptinezumab, PACAP-1 o ACTH-1) y proteínas de la célula hospedadora (tales como proteínas no deseadas de las células CHO).

35

M4. El método de la Modalidad 1, en donde la concentración de arginina o sal de arginina o derivado de arginina está en el intervalo de:

(I) aproximadamente 500 mM a aproximadamente 600 mM;

(II) aproximadamente 525 mM a aproximadamente 575 mM,

(III) aproximadamente 550 mM a aproximadamente 575 mM o

(IV) es aproximadamente 575 mM.

M5. El método de las Modalidades 1 o 2, en donde el pH de una o más soluciones de lavado de (d):

- 5 (i) está comprendido entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 8.7;
 (ii) está comprendido entre aproximadamente 8.2 y aproximadamente 8.7;
 (iii) está comprendido entre aproximadamente 8.5 y aproximadamente 8.7;
 (iv) es/son aproximadamente 8.5;
 (v) es/son aproximadamente 8.6; o
 (vi) es/son aproximadamente 8.7.

10 M6. El método de las Modalidades 1-5, en donde la sal de arginina o derivado de arginina comprende Arg·HCl, acetilarginina, agmatina, ácido argínico, *N*-alfa-butoil-L-arginina o *N*-alfa-pivaloilarginina.

M7. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-6, en donde el anticuerpo monoclonal es específico para CGRP, tal como Eptinezumab según se define mediante

15 una cadena pesada variable con SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera variable con SEQ ID NO: 10 y/o

una cadena pesada con SEQ ID NO: 5 o 6 y una cadena ligera con SEQ ID NO: 11

M8. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-6, en donde el anticuerpo monoclonal es específico para PACAP, tal como PACAP-1 según se define mediante

20 una cadena pesada variable con SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera variable con SEQ ID NO: 20 y/o

una cadena pesada con SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera con SEQ ID NO: 21

M9. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-6, en donde el anticuerpo monoclonal es específico para ACTH, tal como ACTH-1 según se define mediante

25 una cadena pesada variable con SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera variable con SEQ ID NO: 30 y/o

una cadena pesada con SEQ ID NO: 26 o una cadena pesada con SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera con SEQ ID NO: 31

30 M10. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-9, en donde la concentración de arginina en la solución de lavado en d) es aproximadamente 575 mM y el pH es 8.5 u 8.7.

M11. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-9, en donde la concentración de arginina en la una o más soluciones de lavado en d) es aproximadamente 525 mM y el pH es 8.5 u 8.7.

M12. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-11, en donde una o más de las impurezas son una proteína de la célula hospedadora, un ácido nucleico, una variante del producto y/o una endotoxina.

35 M13. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-12, en donde la solución de elución comprende ácido acético de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM y opcionalmente comprende glicina de aproximadamente 20 mM a 50 mM.

M14. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-13, en donde la solución de elución tiene un pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5.

M15. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-14, en donde la solución de elución tiene un pH de aproximadamente 4.

M16. El método de una cualquiera de las Modalidades 1-15, en donde la una o más soluciones de lavado en c) y e) no contienen arginina o una sal de arginina o un derivado de arginina.

5 M17. Una composición farmacéutica que comprende Eptinezumab, PACAP-1 o ACTH-1 obtenida usando el método de acuerdo con la Modalidad 1.

M18. Uso de la composición farmacéutica de acuerdo con la Modalidad 17 que comprende Eptinezumab, PACAP-1 o ACTH-1 como medicamento.

10 M19. La composición farmacéutica que comprende Eptinezumab de acuerdo con la Modalidad M18 para uso en el tratamiento de la cefalea, migraña (tal como migraña crónica o episódica) y cefalea en brotes.

M20. La composición farmacéutica que comprende ACTH-1 de acuerdo con la Modalidad 17 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Cushing o la hiperplasia suprarrenal congénita.

15 M21. La composición farmacéutica que comprende PACAP-1 de acuerdo con la Modalidad M17 para uso en el tratamiento de la cefalea, migraña (tal como migraña crónica o episódica) y cefalea en brotes.

M22. Un método para tratar la cefalea, migraña (tal como migraña crónica o episódica) y cefalea en brotes que comprende administrar una cantidad terapéutica eficaz de Eptinezumab o PACAP-1 obtenida mediante el método de la Modalidad 1.

20 M23. Un método para tratar la enfermedad de Cushing o hiperplasia suprarrenal congénita que comprende administrar una cantidad terapéutica eficaz de ACTH-1 obtenida mediante el método de la Modalidad 1.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 Para explorar el efecto de diferentes concentraciones de arginina y niveles de pH en una solución de lavado en una columna de Proteína A, los inventores de la presente invención estudiaron diferentes condiciones de pH y arginina y midieron diferentes impurezas, incluidas las concentraciones de HCP.

Los intervalos estudiados fueron pH 7.6 - 8.7, arginina 375 - 575 mM y la duración del lavado varió entre 5 - 10 volúmenes de columna (VC).

30 La columna de Proteína A se cargó con medio recogido clarificado filtrado de células CHO que expresaban Eptinezumab. Se recogió Eptinezumab de 6 biorreactores de 3 L y se realizó una filtración en profundidad a 4.34 g/L.

La columna de proteína A se utilizó en las siguientes condiciones:

Paso	Tampón	Volumen (VC)	Velocidad lineal (cm/h)	Límites / Intervalos / Objetivos / Nota(s)
Presaneamiento	NaOH 0.2 M	3	250	Tiempo de contacto = 15 min
Equilibrado	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6.8	5	250	pH: 6.8 ± 0.2 a 24 -26 °C Conductividad: 16.5 - 19.0 mS/cm a 24 -26 °C
Carga	Recogida clarificada y filtrada	Variable	≤ 150	Objetivo de densidad de carga: 40 g/L Tiempo de permanencia: 8 min ID de la carga: CP57-E331
Lavado 1	Fosfato de sodio 20 mM, 100mM NaCl, pH 6.8	5	250	Los mismos que en el equilibrado
Lavado 2	Arg variable de 375 a 575 mM pH variable de pH 7.6 a 8.5 más y 8.7	Variable 5-10 VC	250	Variables para este estudio
Lavado 3	Acetato de sodio 25 mM pH 5.4	5	250	Diferente de EQ
Condicionado del eluato	Ninguno	NA		
Elución	Acetato 50 mM, Glicina 50 mM,	5	250	pH: 3.6 ± 0.2 a 24 -26 °C Conductividad: 0.5 - 1.5 mS/cm

5

10

La columna de Proteína A utilizada fue la resina MabSelect SuRE y el instrumento AKTA Avant (nombre de columna: 20.0 cm/10 mL/0.8 cm -- MabSelect SuRe Lx 10253604 -- n.º col 817)

Las mediciones de HCP se realizaron según el protocolo:

15

- Ensayo inmunoenzimático para la medición de proteínas de la célula hospedadora CHO (Cygnus Technologies n.º de catálogo 550-1)

Reactivos y materiales

20

- Anti-CHO:HRP (F551-1) Anticuerpo de cabra purificado por afinidad conjugado con HRP en una matriz proteica con conservante. 1x12mL
- Tiras de microtitulación recubiertas con anti-CHO F552-1* Tiras de 12x8 pocillos en una bolsa con desecante
- Patrones de HCP de CHO F553-1 HCP de CHO en albúmina sérica bovina con conservante. Patrones en 0, 1, 3, 12, 40 y 100 ng/mL. 1 mL/vial
- Solución de parada de ácido sulfúrico 0.5 M. 1x12mL
- Sustrato TMB F005 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina. 1x12mL
- Concentrado de lavado (20X) F004 Solución salina tamponada con Tris y conservante. 1x50mL

25

- **Mediciones de** – Proteína de la célula hospedadora (HCP)
- Protocolo de ensayo
- 1. Pipetar 100µL de anti-CHO:HRP (n.º F551-1) en cada pocillo.
- 2. Pipetar 50µL de patrones, controles y muestras en los pocillos indicados en la lista de trabajo.

30

- 3. Cubrir e incubar en un agitador orbitálico a 400 – 600 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente, 24°C + 4°C. 4. Verter el contenido de los pocillos en los residuos. Secar y golpear suave pero firmemente sobre papel absorbente para eliminar la mayor parte del líquido residual. No es necesario golpear con mucha agresividad la placa ni usar dispositivos de aspiración al vacío en un intento de eliminar todo el líquido residual y puede provocar una disociación variable del material unido al anticuerpo, lo que resulta en DO más bajas y peor precisión. Llenar los pocillos generosamente hasta que rebosen con solución de lavado diluida utilizando una botella con

35

atomizador o pipeteando ~350 µL. Volcar y golpear nuevamente. Repetir para un total de 4 lavados. Limpiar cualquier líquido del fondo exterior de los pocillos de microtitulación, ya que cualquier residuo puede interferir en el paso de lectura. No permitir que la solución de lavado permanezca en los pocillos durante más de unos pocos segundos.

- 5 • 5. Pipetear 100µL de sustrato TMB (n.º F005).
- 6. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 7. Pipetear 100µL de solución de parada (n.º F006).
- 8. Leer absorbancia a 450/650 nm.

10 La **Tabla 1** muestra las condiciones de lavado, el rendimiento y el contenido de HCP en el eluyente para los experimentos de lavado

TABLA 1

	Orden de ejecución	pH de L2		Arg de L2 (mM)		VC de L2		pH del tampón real		Volumen combinado (mL)	Calc. en peso	Conc. del combinado (mg/mL)	% rendimiento	HCP (ppm)
5	1	8.5	375	7.5	8.51	15.3	26.6	101.7	1183.3					
	2	8.05	375	10	8.02	16.1	25.3	101.8	1214					
	3	7.6	575	5	7.59	16.4	25	102.5	1456.2					
	4	8.5	475	10	8.5	15.8	25.2	99.5	813.7					
10	5	8.05	475	7.5	7.97	16.2	25	101.3	1143.4					
	6	8.05	475	7.5	7.97	16.6	24.4	101.3	1250.7					
	7	8.05	575	10	8.03	13.1	30.7	100.5	880					
	8	8.05	575	10	8.03	14.8	27.1	100.3	788.4					
15	9	8.05	475	7.5	7.97	15.7	26	102.1	1201.9					
	10	8.5	575	7.5	8.51	13.7	26.6	91.1	721.9					
	11	7.6	375	5	7.6	16	25.6	102.4	3647					
	12	8.5	575	7.5	8.51	15.4	26.4	101.6	746.5					
20	13	7.6	433	10	7.58	15.1	26.8	101.2	1375.1					
	14	8.5	475	5	8.5	16.1	25.4	102.2	1227.7					
	15	8.5	475	5	8.5	16.2	25	101.3	1069.6					
	16	7.9	500	5	7.9	15.9	25.6	101.8	1026.6					
25	17	7.9	450	5	7.9	16.6	24.7	102.5	1565.5					
	18	7.9	450	10	7.9	16.5	24.7	101.9	963.1					
	19	8.7	575	5	8.74	16.5	24.6	101.5	865.7					
	20	8.5	475	5	8.5	17.5	23.5	102.8	898.5					
30	21	8.5	375	10	8.51	17.6	23.2	102.1	800.5					
	22	8.5	575	7.5	8.51	18	22.7	102.2	666.2					

Se han obtenido resultados similares purificando los anticuerpos contra PACAP y ACTH (denominados PACAP-1 y ACTH-1 en la presente solicitud) como se describe en la presente invención.

El contenido de HCP para la muestra de PACAP estuvo comprendido entre 156.9 y 294.7 después de la purificación en las mismas condiciones anteriores, mientras que para ACTH se obtuvo un contenido de HCP de aproximadamente 245 a un pH de aproximadamente 8.5 y una concentración de arginina de aproximadamente 575 mM.

En un estudio adicional utilizando pH 8.5 y arginina a 575 mM, el contenido de HCP se redujo hasta de aproximadamente 307 684 ng de HCP/mg de proteína y 700 688 ng de HCP/mg de proteína a aproximadamente 224 ng de HCP/mg de proteína y 220 ng de HCP/mg de proteína respectivamente en dos ejecuciones separadas para PACAP-1. Además, las purificaciones de ACTH-1 muestran una reducción en ng de HCP/mg de proteína de 891 432 a 326 ng/mg (o de 2 104 671 ng/mL de HCP a 10 002 ng/mL de HCP) y de 10 042 454 ng/mg a 232 ng/mg (o de 2 435 063 ng/mL de HCP a 7062 ng/mL).