



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 365**

51 Int. Cl.:
C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07021005 .9**

96 Fecha de presentación : **29.10.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1897890**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **Purificación por afinidad de polipéptido en una matriz de Proteína A.**

30 Prioridad: **27.11.1996 US 31500 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.03.2010

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Blank, Greg S.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 335 365 T3

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

DESCRIPCIÓN

Purificación por afinidad de polipéptido en una matriz de Proteína A.

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a la purificación de proteínas. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para purificar un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno del mismo, que comprende una región CH2/CH3 a través de cromatografía de afinidad con Proteína A.

Descripción de la técnica relacionada

15 La purificación económica de proteínas, a gran escala, se está convirtiendo en un problema de creciente importancia para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas son producidas a través de cultivo celular, utilizando o bien líneas celulares bacterianas o de mamífero, diseñadas para producir la proteína de interés, por medio de la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, las mismas tienen que ser alimentadas con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores del crecimiento, suministrado habitualmente a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos proporcionada como alimento a las células y de los subproductos de las propias células hasta lograr un grado de pureza suficiente para un uso terapéutico constituye un desafío formidable.

25 Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de residuos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Se puede lograr el que algunas proteínas sean secretadas directamente desde la célula en el medio de crecimiento del entorno; otras se obtienen intracelularmente. Para estas últimas, el primer paso de un procedimiento de purificación conlleva la lisis de la célula, la cual puede ser efectuada a través de una diversidad de procedimientos, incluyendo la rotura mecánica, el shock osmótico o los tratamientos enzimáticos. La citada interrupción libera el contenido completo de la célula en el homogenado y, además, genera fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos son generalmente eliminados a través de centrifugación diferencial o a través de filtración. El mismo problema surge, aunque a escala más pequeña, con las proteínas directamente secretadas, debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas de célula huésped intracelular en el transcurso del proceso de producción de la proteína.

30 Una vez se ha obtenido una solución clara que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula es habitualmente intentada utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas en base a su carga, a su grado de hidrofobicidad o su tamaño. Para cada una de estas técnicas se dispone de diversas resinas cromatográficas, las cuales permiten la adaptación ajustada del esquema de purificación a la proteína involucrada en particular. La esencia de cada uno de estos procedimientos de separación reside en el hecho de que las proteínas pueden ser o bien desplazadas en sentido descendente, a diferentes velocidades, a lo largo de una columna larga, lográndose una separación física que se incrementa a medida que desciende adicionalmente por la columna, o bien adherirse selectivamente al medio de separación, siendo después eluidas diferencialmente a través de diferentes disolventes. En algunos casos, la proteína deseada es separada de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "eluido".

45 La cromatografía por afinidad, la cual explota una interacción específica entre la proteína que tiene que ser purificada y un agente de captura inmovilizado, puede constituir también una opción para algunas proteínas. La Proteína A en un adsorbente de utilidad para la cromatografía por afinidad de proteínas, tales como anticuerpos, que contienen una región Fc. La Proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD, procedente de *Staphylococcus aureus*, la cual se une con elevada afinidad (aproximadamente 10^{-8} M para IgG humana) a la región Fc de anticuerpos.

55 Descripción resumida de la invención

Un problema asociado a la cromatografía con Proteína A de preparaciones de proteínicas contaminadas ha sido identificado en el presente documento. En particular, se ha observado que en la cromatografía con Proteína A que utiliza una superficie de sílice o de vidrio para la adsorción de los contaminantes de la Proteína A (por ejemplo, cuando la Proteína A es inmovilizada sobre una columna de vidrio de poro controlado o sobre una columna de ácido silícico), la preparación proteínica (tal como proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP), en la que la preparación proteínica procede de una célula CHO), se adhiere a la superficie de sílice o de vidrio de la fase sólida. Se averiguó que esto ocurría incluso cuando la fase sólida estaba revestida con un reactivo (tal como glicerol) en un intento para evitar la adherencia no específica a la misma. Para solucionar este problema en el presente caso, se ha pensado en un paso de lavado intermedio. Este paso de lavado sirve para eliminar los contaminantes, pero no la Proteína A inmovilizada o la proteína de interés unida a la Proteína A, procedente de la fase sólida. En particular, se ha averiguado que en este paso de lavado intermedio pueden utilizarse electrolitos hidrofóbicos, por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) y cloruro de tetraetilamonio (TEAC).

ES 2 335 365 T3

Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para la purificación de un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno del mismo, que comprende una región CH₂/CH₃, a partir de una solución contaminada del mismo, por medio de cromatografía con Proteína A, que comprende los siguientes pasos, llevados a cabo de forma secuencial: (a) adsorber el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida que comprende sílice o vidrio; (b) eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida mediante el lavado de la fase sólida con un disolvente electrolito hidrofóbico, en donde el disolvente electrolito hidrofóbico comprende cloruro de tetrapropilaminio, cloruro de tetrabutilamonio, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) o cloruro de tetraetilamonio (TEAC); y (c) recuperar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a partir de la fase sólida.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Cuando se utiliza en el presente documento, el término “Proteína A” abarca la Proteína A recuperada a partir de una de sus fuentes de origen natural, la Proteína A producida de forma sintética (por ejemplo, mediante síntesis peptídica o a través de técnicas recombinantes), y variantes de la misma que retienen la capacidad de unión a proteínas que tienen una región C_H2/C_H3. La Proteína A puede ser adquirida comercialmente en Repligen, Pharmacia y Fermatech.

La Proteína A es inmovilizada sobre una fase sólida. Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la cual puede adherirse la Proteína A. La fase sólida de interés en el presente documento es una que comprende una superficie de sílice o de vidrio. La fase sólida puede ser una columna de purificación o una fase discontinua de partículas discretas. En realizaciones preferidas, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En determinadas realizaciones, la fase sólida está revestida con un reactivo (tal como glicerol), el cual pretende evitar la adherencia no específica de contaminantes a la fase sólida.

La proteína de interés en el presente documento es un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno del mismo, que comprende una región C_H2/C_H3 y, por tanto, es susceptible de ser purificado por medio de cromatografía con Proteína A. El término “región C_H2/C_H3”, cuando se utiliza en el presente documento, hace referencia a aquellos restos de aminoácido en la región Fc de una molécula inmunoglobulina que interactúan con la proteína A. En realizaciones preferidas, la región C_H2/C_H3 comprende una región C_H2 intacta seguida de una región C_H3 intacta y, muy preferiblemente, comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Entre los ejemplos de proteínas que contienen una región C_H2/C_H3 se incluyen anticuerpos.

El “paso de lavado intermedio” es un paso llevado a cabo después de que la proteína de interés es depositada sobre la fase sólida y adsorbida a la Proteína A, pero antes de que la proteína sea recuperada desde la columna. El paso de lavado intermedio sirve para eliminar contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida, sin eluir significativamente la proteína de interés desde la fase sólida. En el paso de lavado intermedio, la fase sólida es lavada con un disolvente electrolito hidrofóbico (por ejemplo, el disolvente electrolito hidrofóbico es hecho pasar a través de la columna con Proteína A, en la que la fase sólida es una columna).

El “disolvente electrolito hidrofóbico” en el paso de lavado intermedio es aquel que es capaz de eluir contaminantes unidos a la fase sólida, sin eluir significativamente la Proteína A inmovilizada o la proteína de interés adsorbida a la misma. Preferiblemente, el disolvente electrolito hidrofóbico es un portador acuoso (por ejemplo, un tampón), que comprende uno o más electrolitos hidrofóbicos. Los electrolitos hidrofóbicos son cloruro de tetrametilamonio (TEMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio.

Un “tampón” es una solución tamponada que resiste cambios en el pH a través de la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El “tampón de equilibrio” en el presente documento es aquel utilizado para preparar la fase sólida (con Proteína A inmovilizada) para cargar la proteína de interés. El tampón de equilibrio es preferiblemente isotónico y habitualmente tiene un pH comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. El tampón de equilibrio del ejemplo era Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1. El “tampón de carga” es aquel que es utilizado para cargar la mezcla de la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 y los contaminantes sobre la fase sólida en la que se encuentra inmovilizada la Proteína A. A menudo, los tampones de carga y de equilibrio son los mismos. El “tampón de elución” se utiliza para eluir la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 a partir de la Proteína A inmovilizada. Preferiblemente, el tampón de elución tiene un pH bajo y debido a ello interrumpe interacciones entre la Proteína A y la proteína de interés. Preferiblemente, el tampón de elución a pH bajo tiene un pH comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, muy preferiblemente en la banda comprendida entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4. Entre los ejemplos de tampones que controlarán el pH dentro de esta banda se incluyen tampones fosfato, acetato, citrato y amonio, al igual que combinaciones de los mismos. Los tampones preferidos de entre los anteriores son los tampones citrato y acetato, muy preferiblemente citrato sódico o acetato sódico. Se contemplan otros tampones de elución, incluyendo tampones de pH elevado (por ejemplo, aquellos que tienen un pH de 9 ó superior) o tampones que comprenden un compuesto o una composición tal como MgCl₂ (2 mM) para eluir la proteína de interés.

El término “anticuerpo” se utiliza para indicar el anticuerpo anti-VEGF, y fragmentos de anticuerpos del mismo, siempre que conserven o se modifiquen para comprender una región C_H2/C_H3 tal como se define en el presente documento.

“Fragmentos de anticuerpo” comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o la región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab’, F(ab’)₂ y Fv; moléculas anticuerpo de cadena única; dianticuerpos; anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de anticuerpo.

5 El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, a saber, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, excepto en lo que hace referencia a las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales resultan ser altamente específicos, siendo dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopes), cada uno de los anticuerpos monoclonales va dirigido contra un determinante único sobre el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no tiene que ser construida en el sentido de requerir la producción del anticuerpo a través de cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que tienen que ser utilizados según la presente invención pueden ser preparados a través del procedimiento hibridoma descrito primeramente por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o ser obtenidos por medio de procedimientos de DNA recombinante (ver, por ejemplo, la patente USA n.º. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden ser también aislados a partir de librerías de anticuerpo de fago, utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los presentes anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas), en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, al igual que fragmentos de los citados anticuerpos, en tanto en cuanto los mismos muestren la actividad biológica deseada (patente USA n.º. 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Ci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

El término “región hipervariable”, cuando se utiliza en el presente documento, hace referencia a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido procedentes de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (a saber, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) y/o aquellos restos procedentes de un “bucle hipervariable” (a saber, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Restos “marco” o “FR” son aquellos restos de dominio variable diferentes de los restos de región hipervariable descritos en el presente documento.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores), en las cuales restos de región hipervariable son sustituidos por restos de región hipervariable procedentes de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos (FR) de región marco Fv de inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no son encontrados en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son efectuadas para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, habitualmente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de la secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la que corresponde a la inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Modos para llevar a cabo la invención

El procedimiento del presente documento implica la purificación en contaminantes de una proteína que contiene una región C_H2/C_H3, por medio de cromatografía con Proteína A. La proteína que tiene que ser purificada utilizando cromatografía con Proteína A es un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno del mismo que comprende una región C_H2/C_H3. Las técnicas para la generación de las citadas moléculas serán descritas más adelante.

65

ES 2 335 365 T3

1. Anticuerpos

(i) Selección y preparación de antígeno

5 El anticuerpo del presente documento está dirigido contra un antígeno de interés, es decir VEGF. VEGF es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece de una enfermedad o trastorno puede dar lugar a un beneficio terapéutico en el mamífero.

10 Antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, pueden ser utilizados como inmunógenos para la generación de anticuerpos.

Otros antígenos y formas de los mismos, útiles en la preparación de anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

15

(ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son preferiblemente obtenidos en animales, a través de múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar de utilidad conjugar el antígeno a una proteína que sea inmunogénica en la especie que tiene que ser inmunizada, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, sueroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor tripsina de haba de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster maleimidobenzoil-sulfosuccinamida (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 ó $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

25

Los animales son inmunizados frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados, mediante la combinación, por ejemplo, de $100 \mu\text{g}$ ó $5 \mu\text{g}$ de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyección de la solución, por vía intradérmica, en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales son reforzados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund, a través de inyección subcutánea en múltiples sitios. Entre siete y 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y se somete el suero a ensayo para titulación del anticuerpo. Los animales son reforzados hasta que el título alcanza nivel plano. Preferiblemente, el animal es reforzado con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo reticulado distinto. Pueden también prepararse conjugados en cultivos celulares recombinantes, como fusiones de proteínas. Asimismo, para reforzar la respuesta inmune se utilizan de forma adecuada agentes agregantes.

30

35

(iii) Anticuerpos monoclonales

40 Utilizando el procedimiento hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), pueden obtenerse anticuerpos monoclonales o los mismos pueden ser obtenidos a través de procedimientos de DNA recombinante (patente US n°. 4.816.567).

En el procedimiento hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster o un mono macaco, es inmunizado tal y como se ha descrito anteriormente, para generar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la proteína utilizada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos son después fusionados con células mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academia Press, 1986)).

50

Las células hibridoma preparadas de esta forma son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado, el cual contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células mieloma parentales carecen del enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT ó HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopeptirina y timidina (medio HAT), sustancias éstas que evitan el crecimiento de células deficitarias en HGPRT.

55

Las células mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, apoyan la producción estable a alto nivel de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas y resultan sensibles a un medio tal como un medio HAT. De entre las mismas, las líneas celulares mieloma preferidas son las líneas mieloma de mudo, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA y las células SP-2 ó X63-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano han sido también descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New Cork, 1987).

65

El medio de cultivo en el cual se cultivan las células hibridoma es sometido a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células hibridoma es determinada por medio de inmunoprecipitación o a través de un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

Una vez identificadas las células hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitativos y cultivados por medio de procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores ascito en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascito o suero, a través de procedimientos de purificación con inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, Proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad. Preferiblemente se utiliza el procedimiento de cromatografía con Proteína A descrito en el presente documento.

El DNA que codifica para los anticuerpos monoclonales es aislado y secuenciado rápidamente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células hibridoma sirven como fuente preferida del citado DNA. Una vez aislado, el DNA puede ser colocado en vectores de expresión, los cuales son después transfectados en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células mieloma que no producen, por otro lado, proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

El DNA puede ser también modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena ligera y pesada humanos en lugar de las secuencias de murido homólogas (patente US n°. 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.

Habitualmente, los dominios constantes de un anticuerpo son sustituidos por los citados polipéptidos no inmunoglobulina, o los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo son sustituidos por los citados polipéptidos no inmunoglobulina, con vistas a crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno, que presenta especificidad para un antígeno, y otro sitio de combinación con antígeno que presenta especificidad para un antígeno diferente.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos monoclonales a partir de librerías de fago de anticuerpo generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murido y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fago. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (rango nM) mediante mezclado de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Tecnology, 10 779-783 (1992)), al igual que mediante infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir librerías de fago muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas constituyen alternativas viables a las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

(iv) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácido introducidos en su interior para formar una fuente que es no humana. Estos restos aminoácido no humanos son a menudo referenciados como restos de "importación", los cuales son habitualmente obtenidos de un dominio variable de "importación". La humanización puede ser esencialmente llevada a cabo siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de las secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes secuencias CDR o CDRs de un roedor. Por consiguiente, los citados anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente USA n°. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los cuales algunos restos CDR, y posiblemente algunos restos FR, son sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utiliza en la preparación de anticuerpos humanizados resulta muy importante a la hora de reducir la antigenicidad. Según el denominado procedimiento "mejor adaptado", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es cribada frente a la librería completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está situada más próxima a la del roedor es después aceptada como el FR humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993)). Otro procedimiento utiliza un marco particular, derivado a partir de la secuencia consenso de todos los

anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede ser utilizado para diferentes anticuerpos humanizados diversos (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993).

5 Resulta adicionalmente importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de elevada afinidad para el antígeno y otras favorables propiedades biológicas. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados son preparados a través de un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales, utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles comercialmente y resultan fami-
10 lieres para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del probable rol de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, a saber, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos FR y ser combinados desde el recep-
15 tor e importar secuencias, a los efectos de lograr el que las características deseadas del anticuerpo, tales como una afinidad incrementada para el antígeno(s) objetivo sean alcanzadas. En general, los restos CDR están directa y muy sustancialmente involucrados y ejercen influencia en la unión a antígeno.

Alternativamente, resulta ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmu-
20 noglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen (J_H) de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes y de línea germinal y quiméricos, da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La transferencia de la matriz de gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en los citados ratones mutantes de línea germinal da lugar a la producción de anticuerpos humanos, tras desa-
25 safío con antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos pueden ser también derivados a partir de librerías que muestran fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14: 309 (1996)).

30

(v) Fragmentos de anticuerpos

Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos
35 fragmentos fueron derivados a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). No obstante, estos fragmentos pueden ser ahora producidos a través de células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados a partir de las librerías fago de anticuerpo discutidas anteriormente. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH pueden ser directamente recuperados a partir de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992). Según otro planteamiento, fragmentos F(ab')₂ pueden ser aislados directamente a partir de cultivos celulares de huésped recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 93/16185.

45

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos presentan especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Si bien las citadas moléculas se unirán normalmente tan solo a dos antígenos (a saber, anticuerpos biespecíficos, BsAbs),
50 anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos triespecíficos, quedan englobados dentro de esta expresión cuando se utiliza en el presente documento.

En el estado de la técnica se tiene conocimiento de la existencia de procedimientos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa está basada en
55 la co-expresión de dos pares cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas presentan diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas anticuerpo, de las cuales tan solo una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, lo cual se efectúa habitualmente mediante pasos de cromatografía por afinidad, resulta algo engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. En el documento WO 93/08829 se describen procedimientos similares y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Según otro planteamiento descrito en el documento WO 96/27011, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser diseñada con vistas a maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados a partir de cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). En la interfase de la segunda molécula de anticuerpo se crean "cavidades" compensatorias de

65

tamaño idéntico o similar a las de la cadena(s) grandes, mediante la sustitución de las cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

5 Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos “heteroconjugados” o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede ser acoplado a avidina, el otro a biotina. Los citados anticuerpos han sido, por ejemplo, propuestos para dirigir células del sistema inmune hacia células no queridas (patente US n° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden ser preparados utilizando cualquier procedimiento de reticulación adecuado. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos por parte de los expertos en la materia y se describen en la patente US n° 4.676.980, junto con un determinado número de técnicas de reticulado.

15 En la literatura se han descrito también técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos procedentes de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando uniones químicas. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos son rotos proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados son después convertidos en derivados tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB es después reconvertido en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y mezclado con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB, para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser utilizados para la inmovilización selectiva de enzimas.

25 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, los cuales pueden ser acoplados químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ anticuerpo biespecífico humanizado. Cada uno de los fragmentos Fab' fue secretado de forma separada a partir de *E. coli* y sometido a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico obtenido de esta forma era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, al igual que desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a objetivos tumor de mama humano.

30 Se han descrito también diversas técnicas para la preparación y aislamiento de fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera leucina procedentes de proteínas Fos y Jun estaban unidos a las partes Fab' de los anticuerpos diferentes a través de fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpo fueron reducidos en la región bisagra para formar monómeros y después re-oxidados para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento puede ser también utilizado para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de diacuerpo descrita por parte de Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para la obtención de fragmentos biespecíficos de anticuerpo. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H), conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) a través de un elemento de unión que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formándose gracias a ello, dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo a través de la utilización de dímeros Fv(sFv) de cadena única, ha sido también descrita. Ver Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser “anticuerpos lineales”, tal y como se describe en Zapata *et al.* Protein Eng 8 (10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd tandem (V_H-C_H1-V_H-C_H1), que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

50 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

55 2. Purificación de proteínas

La proteína que tiene que ser purificada utilizando el procedimiento descrito en el presente documento es producida generalmente utilizando técnicas recombinantes. En los documentos de patente US nos. 5.534.615 y 4.816.567 se describen, por ejemplo, procedimientos para la producción de proteínas recombinantes, los cuales son incorporados en el presente documento por medio de referencia. En realizaciones preferidas, la proteína de interés es producida en una célula CHO (ver, por ejemplo, WO 94/11026).

65 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la proteína puede ser producida de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretada directamente en el medio. Si la proteína es producida de forma intracelular, como primer paso, el residuo en forma de partícula, ya se trate de células huésped o de fragmentos sometidos a lisis, es eliminado, por ejemplo, por medio de centrifugación o ultrafiltración. Cuando la proteína es secretada en el medio, las células huésped recombinantes pueden ser separadas del medio de cultivo celular por medio, por ejemplo, filtración con flujo tangencial.

ES 2 335 365 T3

La Proteína A como ligando específico para el aislamiento de inmunoglobulinas se describe en "Basic and Clinical Immunology-Seventh Edition", editado por DP Sites and AI Terr, página 233 y en US 5.429.746.

La Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida es utilizada para purificar la proteína que contiene la región C_H2/C_H3 . La fase sólida es, preferiblemente, una columna que comprende una superficie de sílice o de vidrio para inmovilizar la Proteína A. Preferiblemente, la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. A veces, la columna ha sido revestida con un reactivo, tal como glicerol, en un intento para evitar la adherencia no específica a la misma. La columna PROSEP ATM, disponible comercialmente en Bioprocessing Limited, constituye un ejemplo de una columna de vidrio de poro controlado de Proteína A que está revestida con glicerol.

La fase sólida para la cromatografía con Proteína A es equilibrada con un tampón adecuado. Por ejemplo, el tampón de equilibrio puede ser Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1.

La preparación contaminada derivada de las células huésped recombinantes es depositada sobre la fase sólida equilibrada, utilizando un tampón de carga que puede ser igual que el tampón de equilibrio. A medida que la preparación contaminada fluye a través de la fase sólida, la proteína es adsorbida por la Proteína A inmovilizada y, tal y como se ha indicado en el presente documento, otros contaminantes (tales como proteínas de Ovario de Hamster Chino, CHOP, en los que la proteína es producida en una célula CHO), se unen de forma no específica a la fase sólida.

El siguiente paso llevado a cabo de forma secuencial conlleva la eliminación de los contaminantes unidos a la fase sólida, por medio del lavado de la fase sólida con un disolvente electrolito hidrofóbico, en un paso de lavado intermedio en el que la solución comprende cloruro de tetrapropilamonio, cloruro de tetrabutilamonio, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) y/o cloruro de tetraetilamonio (TEAC) como electrolito hidrofóbico. En realizaciones preferidas, el electrolito hidrofóbico en este disolvente de lavado es TEMAC y/o TEAC. Si bien puede encontrarse presente un único electrolito hidrofóbico en el disolvente de lavado, en determinadas realizaciones, pueden utilizarse dos o más electrolitos. El electrolito hidrofóbico es preferiblemente añadido a una solución de pH tamponado que tiene un pH comprendido en la banda que oscila entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 y, preferiblemente, en la banda comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. Entre los tampones adecuados para este propósito se incluyen tampones Tris, fosfato, MES y MOPSO. La concentración final preferida para el electrolito hidrofóbico en el disolvente de lavado está comprendida en la banda que oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 M y, preferiblemente, en la banda comprendida entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,5M.

Después del paso de lavado intermedio del párrafo precedente, la proteína de interés es recuperada de la columna. Esto se logra habitualmente utilizando un tampón de elución adecuado. La proteína puede, por ejemplo, ser eluida de la columna utilizando un tampón de elución que tiene un pH bajo, por ejemplo, comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 y, preferiblemente, en la banda comprendida entre aproximadamente 2,5 y 3,5. Entre los ejemplos de tampones de elución adecuados a tal efecto se incluyen los tampones acetato y citrato.

La preparación de proteína eluida puede ser sometida a pasos de purificación adicionales, ya sea con anterioridad a o con posterioridad a la cromatografía por afinidad, utilizando un anticuerpo para capturar la proteína; cromatografía de interacción hidrofoba (HIC); precipitación con sulfato amónico; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice; cromatofocalización y filtración en gel.

La proteína recuperada de este modo puede ser formulada en un soporte farmacéuticamente aceptable y es utilizada para diversos usos en diagnóstico, terapéutica o en otros usos conocidos para las citadas moléculas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo. Las descripciones de todas las referencias en la memoria se incorporan expresamente en el presente documento por medio de referencia.

Ejemplo 1

La columna PROSEP ATM (Bioprocessing, Ltd) tiene Proteína A inmovilizada sobre una columna de vidrio de poro controlado revestida con glicerol. El revestimiento de glicerol reduce la superficie de vidrio disponible para interacciones no específicas con contaminantes pero, tal y como se demuestra en el presente documento, los contaminantes todavía pueden adherirse a la columna.

La cromatografía con Proteína A era el paso inicial cromatográfico en la purificación de la proteína que contienen la región C_H2/C_H3 ; anticuerpo anti-HER2 humanizado (humAb4D5-8) (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4285-4289 (1992)). Este anticuerpo anti-HER2 fue producido de forma recombinante en células CHO. Después de la producción y secreción de proteína en el medio de cultivo celular, las células CHO fueron separadas del medio de cultivo celular a través de filtración con flujo tangencial (PROS-TACKTM). En este sistema de expresión, los contaminantes más prevalentes fueron encontrados en las Proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP).

La columna PROSEP ATM fue equilibrada con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1 (Tampón A). Se llevó a cabo una cromatografía con Proteína A, mediante la aplicación del fluido de cultivo celular recolectado (HCCF) procedente de las células CHO, directamente hacia la columna PROSEP ATM equilibrada, utilizando Tampón A como tampón de carga. La columna fue después lavada con Tampón A para eliminar por lavado las proteínas no

ES 2 335 365 T3

5 unidades y el HCCF. El anticuerpo anti-HER2 fue eluido de la columna de Proteína A mediante lavado de la columna con Tampón B, que tiene un pH bajo (2,5-3,5). El Tampón B era una solución de citrato sódico 25 mM, pH 2,8. El bajo pH del tampón B interrumpía las interacciones entre la Proteína A y el anticuerpo anti-HER2. También interrumpía las interacciones no específicas entre las superficies de cristal expuestas de la columna y el CHOP contaminante no unido específicamente. Esto dio lugar a un nivel de contaminación de CHOP en la agrupación de proteína que contiene anti-HER2 eluido de aproximadamente 4.000 ppm (tabla 1).

TABLA 1^a

Muestra	Condiciones	CHOP	
		($\mu\text{g/ml}$)	(ppm)
HCCF	Carga	760	1.461.538
Agrupación de anticuerpo	Sin lavado	32	4.270
Agrupación de anticuerpo	TMAC, lavado pH 5,0	3	408
Agrupación de anticuerpo	TEAC, lavado pH 5,0	2	317
Agrupación de anticuerpo	TMAC, lavado pH 7,1	4	537
Agrupación de anticuerpo	TEAC, lavado pH 7,1	5	620
^a El tampón de lavado era Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, incluyendo o bien TMCA 0,5 M o TEAC, al pH indicado. Después del lavado, la proteína fue eluida a pH 2,8			

Con vistas a solucionar este problema que concierne a los contaminantes en la agrupación de proteína eluida, se evaluó un “paso de lavado intermedio”. Con anterioridad a la elución del anticuerpo de la columna, la columna con Proteína A fue lavada con tampón de lavado (a diferentes pHs), al cual se le añadieron concentraciones diversas de TMAC o TEAC (Tabla 1).

Tal y como se muestra en la Tabla 1, el paso de lavado intermedio que utiliza un tampón que contiene o bien TMAC o TEAC resultaba eficaz en la reducción del nivel de CHOP en la agrupación de anticuerpo eluida. La concentración de o bien TMAC o TEAC resultaba preferiblemente inferior a 0,25 M. Por consiguiente, se averiguó que las concentraciones de TMAC o TEAC preferidas en el disolvente de lavado oscilan entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 M y, preferiblemente, entre aproximadamente 0,25 y 0,5 M.

En lo que hace referencia a las variaciones en el pH de la solución de lavado, se averiguó que cuanto más bajo era el pH mayor era la eliminación de CHOP en el paso de lavado. No obstante, a pHs situados por debajo de 7,0, la proteína puede resultar también eluida durante el paso de lavado. Por consiguiente, los pHs preferidos para el paso de lavado intermedio oscilan entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 y, preferiblemente, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

60 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

ES 2 335 365 T3

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4816567 A [0016] [0017] [0026]
- WO 9100360 A [0045]
- [0034] [0037] [0050]
- WO 921200373 A [0045]
- WO 9316185 A [0041]
- EP 03089 A [0045]
- WO 9308829 A [0043]
- US 3534615 A [0050]
- WO 9627011 A [0044]
- WO 9411026 A [0050]
- US 4676980 A [0045]
- US 5429746 A [0052]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- KOHLER *et al. Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0016] [0026]
- CLACKSON *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0016] [0036]
- MARKS *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0016] [0036] [0040]
- MORRISON *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0017]
- KABAT *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health*, 1991 [0018]
- CHOTHIA; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0018]
- JONES *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0019] [0037]
- RIECHTNANN *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0019]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0019]
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press*, 1986, 59-103 [0027][0031]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0029]
- BRODEUR *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0029]
- MORRISON *et al. Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0034]
- MCCAFFERTY *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0036]
- MARKS *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0036]
- WATERHOUSE *et al. Nuc. Acids. Res*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0036]
- RIECHMANN *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0037]
- VERHOEYEN *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0037]
- SIMS *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0038]
- CARTER *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0038]
- PRESTA *et al. J. Immunol*, 1993, vol. 151, 2623 [0038]
- JAKOBOVITS *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0040]
- JAKOBOVITS *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0040]
- BRUGGERMANN *et al. Year in Immuno*, 1993, vol. 7, 33 [0040]
- DUCHOSAL *et al. Nature*, 1992, vol. 355, 258 [0040]

ES 2 335 365 T3

- **HOOGENBOOM** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0040]
- **VAUGHAN** *et al. Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 309 [0040]
- 5 • **MORIMOTO** *et al. Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0041]
- **BRENNAN** *et al. Science*, 1985, vol. 229, 81 [0041] [0046]
- **CARTER** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0041]
- 10 • **MILLSTEIN** *et al. Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0043]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0043]
- 15 • **SHALABY** *et al. J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0047]
- **KOSTELNY** *et al. J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0048]
- **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0048]
- 20 • **GRUBER** *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0048]
- **ZAPATA** *et al. Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0048]
- 25 • **TUTT** *et al. J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0049]
- *Basic and Clinical Immunology*. 233 [0052]
- **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad Sci.*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0062]
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para purificar un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno del mismo, que comprende una región C_H2/C_H3, a partir de una solución contaminada del mismo, por medio de cromatografía con Proteína A, que comprende:

(a) adsorber el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida que comprende sílice o vidrio;

10 (b) eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida, mediante lavado de la fase sólida con un disolvente electrolito hidrofóbico, en donde el disolvente electrolito hidrofóbico comprende cloruro de tetrapropilamonio, cloruro de tetrabutilamonio, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) o cloruro de tetraetilamonio (TEAC); y

15 (c) recuperar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo a partir de la fase sólida.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el disolvente electrolito hidrofóbico comprende cloruro de tetrametilamonio (TMAC).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una columna de vidrio de poro controlado.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase sólida es una columna de ácido silícico.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los contaminantes son proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP).

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración del electrolito hidrofóbico en el disolvente electrolito hidrofóbico se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 M.

30 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la concentración de electrolito hidrofóbico en el disolvente electrolito hidrofóbico se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,5 M.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH del disolvente electrolito hidrofóbico se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el pH del disolvente electrolito hidrofóbico se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

40 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el paso (c) comprende eluir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo utilizando un tampón de elución que tiene un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 5,0.

45 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el paso (c) comprende eluir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo utilizando un tampón de elución que tiene un pH en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5.

50

55

60

65