



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 687**

(51) Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04700878 .4**

(86) Fecha de presentación : **08.01.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1581644**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

(54) Título: **Purificación de polipéptidos.**

(30) Prioridad: **09.01.2003 US 439418 P**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

(72) Inventor/es: **Lester, Philip, M. y**  
**Persson, Josefine**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 287 687 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 de polipéptidos.

5 **Antecedentes de la invención**

1. **Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a un proceso para purificar polipéptidos de interés a partir de caldo u homogenado de fermentación microbiana. Más particularmente, se introduce un agente de precipitación en el caldo u homogenado para realizar por ejemplo la retirada de proteínas, ADN y restos celulares.

15 2. **Descripción de la técnica relacionada**

La aparición de la tecnología recombinante permite hoy en día la producción de altos niveles de proteínas con células hospedadoras transformadas de forma adecuada. Como resultado existe una demanda en aumento de métodos de purificación rápidos, robustos y eficaces para recuperar las proteínas producidas de forma recombinante. Generalmente, las proteínas se producen cultivando células tales como líneas celulares de mamífero, de insecto, de hongos y de bacterias manipuladas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esta proteína. Puesto que las líneas celulares usadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de cultivo complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento suministrados normalmente a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos que se administra a las células y de los subproductos de las propias células a una pureza suficiente para su uso como compuesto terapéutico humano plantea un desafío formidable.

25 Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de restos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Algunas proteínas pueden secretarse directamente de la célula en los medios de cultivo que la rodean; otros se preparan de forma intracelular. Para los polipéptidos que se producen en células de mamífero, el sistema de purificación es significativamente más fácil que para los polipéptidos producidos en otro tipo de células hospedadoras. Las células de mamífero exportan los polipéptidos de modo que pueden recogerse del medio de cultivo, donde están presentes en forma relativamente pura. Sin embargo, si el polipéptido se produce en una célula no de mamífero, por ejemplo un microorganismo tal como hongos o *E. coli*, el polipéptido se recuperará del interior de la célula o en el espacio periplasmático (Kipriyanov y Little, *Molecular Biotechnology*, 12, 173-201 (1999); Skerra y Pluckthun, *Science*, 240: 1038-1040 (1988)). De hecho, es necesario liberar la proteína de las células al medio extracelular mediante extracción tal como lisis celular. Dicha alteración libera todo el contenido de la célula en el homogenado y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos se retiran generalmente mediante centrifugado diferencial o mediante filtración.

40 La lisis celular se realiza típicamente usando técnicas de alteración mecánica tales como homogeneización o tritación de la parte superior. Aunque la proteína de interés generalmente se libera de forma eficaz, dichas técnicas tienen varias desventajas (Engler, *Protein Purification Process Engineering*, Harrison eds., 37-55 (1994)). Los aumentos de temperatura, que se producen a menudo durante el procesamiento, pueden dar como resultado la inactivación de la proteína. Además, la suspensión resultante contiene un amplio espectro de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos 45 contaminantes. Los ácidos nucleicos y los polisacáridos aumentan la viscosidad de la solución complicando potencialmente el posterior procesamiento mediante centrifugado, filtración en flujo cruzado o cromatografía. Las asociaciones complejas de estos contaminantes con la proteína de interés pueden complicar el proceso de purificación y dar como resultado rendimientos inaceptablemente bajos.

50 De este modo, medios más selectivos de liberación de proteínas intracelulares facilitan el proceso adicional. Se han presentado varias técnicas que permeabilizan células y/o extraen proteínas intracelulares. Estos métodos incluyen el uso de disolventes, detergentes, agentes caotrópicos, antibióticos, enzimas y agentes quelantes para potenciar la permeabilidad celular y/o promover la extracción. La adición de algunos compuestos, tales como glicina, al medio de fermentación durante el crecimiento de cultivo también ha demostrado promover la liberación de algunas enzimas intracelulares. Finalmente, las técnicas tales como el tratamiento de congelación/descongelación o de choque osmótico 55 también han demostrado liberar subconjuntos de proteínas intracelulares.

60 Sin embargo, estas técnicas no son necesariamente aplicables a todas las proteínas microbianas intracelulares y todas tienen una aplicación limitada para el procesamiento a gran escala y/o otras desventajas. Por ejemplo, aunque disolventes tales como tolueno y cloroformo promueven la liberación de proteínas intracelulares, se sabe que estas sustancias son tóxicas y/o carcinogénicas (Windholtz *et al.*, *The Merck Index* 10<sup>a</sup> Edición: 300 y 1364 (1983)). Los detergentes iónicos, tales como SDS, a menudo desnaturalizan de forma irreversible las proteínas aisladas. Aunque los detergentes no iónicos normalmente no son desnaturalizantes, las proteínas recuperadas a menudo se asocian con micelas de detergentes que pueden necesitar un procesamiento adicional para producir la proteína libre de detergente. 65 Los agentes caotrópicos, tales como urea y clorhidrato de guanidina, pueden ser desnaturalizantes a las concentraciones requeridas para la liberación completa y su eficacia puede depender de la fase de crecimiento del cultivo. El uso de lisozima, que posibilita un medio relativamente moderado de liberación de proteína, está limitado por su coste relativamente alto y por la necesidad posterior de purificar la proteína de interés del reactivo enzimático. Además, los agentes

quelantes, que se usan a menudo para potenciar la eficacia de otras técnicas de permeabilización/liberación tales como extracción con lisozima o tolueno, sufren la desventaja de la liberación no específica de proteínas hospedadoras.

5 Otros métodos para la liberación de proteínas también tienen desventajas. Por ejemplo, el choque osmótico, en el que las células se suspenden en un medio de alta osmolaridad, se recuperan y después se colocan en un tampón de baja osmolaridad, requiere etapas de procesamiento adicionales con respecto a otras alternativas de extracción (Moir *et al.*, *Separation Processes in Biotechnology*, Asenjo eds: 67-94 (1990)) o necesitan el manejo de grandes volúmenes de líquido a bajas temperaturas. Esto hace que el método sea poco atractivo para el procesamiento a gran escala.

10 El tratamiento de congelación/descongelación también libera proteínas intracelulares, aunque los rendimientos relativamente bajos a menudo dan como resultado múltiples ciclos o requisitos de procesamiento adicionales. Además, la congelación de la pasta celular es un requisito de procesamiento no trivial añadido en comparación con otras alternativas de extracción.

15 Finalmente, se han añadido reactivos, tales como glicina durante la fermentación para promover la liberación de proteínas al medio extracelular (Aristidou *et al.*, *Biotechnology Letters* 15: 331-336 (1993)). Aunque se ha presentado la liberación parcial de varias proteínas intracelulares, este enfoque requiere el acoplamiento directo de la fermentación y las estrategias de liberación y la posterior preparación de la proteína de interés a partir de un caldo extracelular potencialmente complejo.

20 Una vez que el polipéptido de interés se libera de la célula hospedadora, se requiere la purificación del mismo de otros componentes celulares. Desafortunadamente, la mayoría de los enfoques de extracción, tales como lisis celular, no solamente exponen a la proteína a la degradación potencial por las proteasas de la célula hospedadora, sino que también hacen más difícil el aislamiento de la proteína a partir de otros elementos de la suspensión resultante. Por 25 ejemplo, la presencia de moléculas cargadas negativamente, tales como ADN, ARN, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), requiere a menudo el uso de cromatografía de intercambio aniónico (Sassenfeld, *TIBTECH*, 8: 88-93 (1990); Spears, *Biotechnology*, vol. 3-Bioprocessing, Rehm eds: 40-51 (1993)) y/o la precipitación con policationes tales como sulfato de protamina (Kelley *et al.*, *Bioseparation*, 1: 333-349 (1991); Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 2<sup>a</sup> edición, Cantor eds., págs. 21-71 (1987)), sulfato de estreptomicina (Wang *et al.*, eds, *Fermentation and Enzyme Technology*: 253-256 (1979)), polietilenimina (PEI) (Kelley *et al.*, *supra*; Sassenfeld, *supra*; Cumming *et al.*, *Bioseparation*, 6: 17-23 (1996); Jendrisak, *The use of polyethylenimine in protein purification. Protein purification: micro to macro*, ed. Alan R., Liss, Inc, 75-97 (1987); Salt *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 107-30 30 113 (1995)), y/o extracción de dos fases acuosas con sistemas de polímeros inmiscibles tales como polietilenglicol (PEG)/fosfato o PEG/dextrano (Kelley *et al.*, *supra*, Strandberg *et al.*, *Process Biochemistry* 26: 225-234 (1991)).

35 Como alternativa, la proteína de interés puede precipitarse de los contaminantes polianiónicos no proteicos a través de la adición de una sal neutra tal como sulfato de amonio o cloruro de potasio (Wheelwright, *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*: 87-98 (1991); Englard *et al.*, *Methods in Enzymology Volume 182*, Deutscher eds.: 285-300 (1990)) y/o un polímero tal como PEG o sulfato de dextrano (Wang *et al.*, *supra*; Wheelwright, *supra*). Cuando la proteína de interés está cargada positivamente, tenderá a unirse a cualquier molécula cargada negativamente presente en el medio, haciendo la purificación de la proteína virtualmente imposible.

40 Típicamente, los investigadores han utilizado las etapas de fraccionamiento inicial, descritas anteriormente, para separar los polianiones conflictivos de la proteína de interés. Desafortunadamente, cada uno de estos métodos de separación inicial padece varias desventajas, especialmente cuando se usa en la fabricación de reactivos farmacéuticos. Por ejemplo, las grandes cantidades de contaminantes polianiónicos no proteicos descubiertos en lisados bacterianos tienden a reducir las capacidades de unión de las resinas de cromatografía de intercambio aniónico. Además, los protocolos de regeneración a menudo se vuelven ineficaces debido a la unión tenaz de los polianiones con las resinas (Spears, *supra*). Finalmente, las condiciones de baja fuerza iónica que favorecen la unión de la proteína son ineficaces 45 para alterar las interacciones polianión-proteína y dan como resultado una falta de separación (Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 3<sup>a</sup> edición, Cantor eds., p. 171 (1994)). Las preparaciones de sulfato de protamina plantean muchas preocupaciones acerca de contaminación con proteasa y partículas virales. Además, puede producirse una precipitación de proteínas no deseada usando este reactivo (Scopes, *Protein Purification Principles and Practice*, 2<sup>a</sup> edición, Cantor eds., 21-71 (1987)).

50 55 En el procesamiento de proteínas farmacéuticas, no se usa generalmente el sulfato de estreptomicina debido a la aprehensión general acerca del uso de antibióticos como reactivos del proceso (Scawen *et al.*, *Handbook of Enzyme Biotechnology* 2<sup>a</sup> edición, Wiseman eds.: 15-53 (1985)). Las preparaciones de PEI a menudo están contaminadas con cantidades variables de monómero de etilenimina, un agente que se sospecha es cancerígeno (Scawen *et al.*, *supra*). El PEI tiende también a unirse de forma irreversible a muchas resinas de cromatografía, limitando de este modo su eficacia y la cantidad de resinas de cromatografía potenciales disponibles para el uso después de la eliminación del PEI. En general, los sistemas de extracciones de dos fases acuosas son difíciles de predecir y a menudo requieren un enfoque empírico para determinar las condiciones que desplazan a la proteína de interés a la fase acuosa apropiada (Kelley *et al.*, *supra*).

60 65 Las técnicas que precipitan específicamente la proteína de interés a menudo dan como resultado el atrapamiento de los contaminantes no proteicos acuosos en el precipitado, haciendo la separación ineficaz (Scopes, *supra*; Wheelwright, *supra*).

# ES 2 287 687 T3

Los ejemplos de patentes que describen la recuperación y purificación de proteínas incluyen las siguientes:

La Patente de Estados Unidos N° 5.665.866 describe un proceso para obtener anticuerpo en forma soluble y correctamente plegada y ensamblada. Comprende una etapa de elevación de la proteína de funcionamiento desde 34 a 60°C en un tiempo en el proceso seleccionado para facilitar el posterior aislamiento del anticuerpo soluble, y plegado y ensamblado correctamente, sustancialmente libre de otro material relacionado con anticuerpos.

La Patente de Estados Unidos N° 5.760.189 describe un procedimiento para liberar una proteína de fusión similar a tiorredoxina a partir de *E. coli*, que incluye material no proteico cargado negativamente, en una solución añadiendo un quelante a la solución y precipitando el material no proteico cargado negativamente a partir de la solución añadiendo una solución divalente de catión/alcohol a la solución para formar una primera fracción soluble que contiene la proteína y una primera fracción insoluble que contiene los contaminantes no deseados. Opcionalmente, la temperatura antes de la adición del quelante puede ser sustancialmente más baja que después de la adición del quelante. El catión divalente incluye por ejemplo, magnesio, manganeso y calcio en solitario o en combinación.

La Patente de Estados Unidos N° 5.714.583 describe métodos para la purificación del factor IX en una solución que comprende las etapas de aplicación de la solución que contiene el factor IX a una resina de intercambio aniónico, lavar la resina de intercambio aniónico con una solución que tiene una conductividad que es menor que la necesaria para eluir el factor IX de la resina, eluir la resina de intercambio aniónico con un primer eluyente para formar un primer eluato, aplicar el eluato a una resina de heparina o similar a heparina (por ejemplo, una matriz cargada negativamente), eluir la heparina o resina similar a heparina con un segundo eluyente para formar un segundo eluato, aplicar el segundo eluato a una resina de hidroxiapatita y después eluir la resina de hidroxiapatita con un tercer eluyente para formar un tercer eluato que contiene el factor IX purificado.

La Patente de Estados Unidos N° 6.322.997 describe un método para recuperar un polipéptido que comprende exponer una composición que comprende un polipéptido a un reactivo que se une a o modifica el polipéptido, en el que el reactivo se inmoviliza sobre una fase sólida. Y después pasar la composición a través de un filtro que tiene una carga que es opuesta a la carga del reactivo en la composición, para retirar el reactivo lixiviado de la composición.

La Patente de Estados Unidos N° 6.214.984 describe una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo (LP-HIC) para la purificación de anticuerpos. En particular, la patente proporciona un proceso para purificar un anticuerpo a partir de un contaminante que comprende introducir una mezcla que contiene el anticuerpo y el contaminante en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba y eluir el anticuerpo de la columna con un tampón que tiene un pH de aproximadamente 2,5 - 4,5. Normalmente, la mezcla introducida en la columna está a aproximadamente el mismo pH que el tampón de elución.

La Patente de Estados Unidos N° 6.121.428 proporciona un método para recuperar un polipéptido que comprende exponer una composición que comprende un polipéptido a un reactivo que se une a, o modifica, el polipéptido, en el que el reactivo se inmoviliza sobre una fase sólida; y después pasar la composición a través de un filtro que tiene una carga que es opuesta a la carga del reactivo en la composición, para retirar el reactivo lixiviado de la composición.

La Patente de Estados Unidos N° 5.641.870 proporciona un proceso para purificar un anticuerpo en el que la mezcla que contiene el anticuerpo y el contaminante se somete a LPHIC opcionalmente a una concentración salina baja. El anticuerpo se eluye de la columna en la fracción que no se une a ésta. En la etapa de extracción, los sedimentos celulares congelados se resuspenden a temperatura ambiente en tampón MES 20 mM, pH 6,0 que contiene EDTA 5 mM y 4,4'-DTP 20 mM disuelto previamente en etanol (3 litros de tampón/kg de sedimento celular). Las células suspendidas se alteran mediante dos pasos a través de un homogeneizador Mantin Gaulin a 5500 a 6500 PSI. El homogenizado se ajusta al 0,25% (v/v) con polietileneimina (PEn y se diluye con un volumen igual de agua purificada a 2-8°C. El homogenizado diluido se centrifuga después. El fragmento de anticuerpo se encuentra en el sobrenadante.

La Solicitud de Patente Japonesa 60-258127 describe un método para la producción de vacuna para la hepatitis B caracterizado por la extracción de HBsAg obtenido de la manipulación genética de células microbianas y el refinado del mismo en un proceso que incluye las etapas de un fraccionamiento basado en la diferencia de solubilidad tal como una combinación de tratamiento con acrinol y tratamiento con bentonita, adsorción con sílice coloidal, cromatografía de afinidad usando anticuerpo HBs, centrifugado por gradiente de densidad y diálsis.

Históricamente, la inmunoglobulina G (IgG) se ha purificado a partir del suero y plasma humanos (Putnam, ed., *The Plasma Proteins*, vol. 1 (Academic Press, 1975)). El proceso de purificación ha contenido a menudo una o más etapas de precipitación. El esquema de precipitación usado más comúnmente para recuperar IgG es el fraccionamiento de Cohn (Cohn *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72: 465 (1950)). Sin embargo, se han presentado otras técnicas de precipitación (Niederauer y Glatz. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 47 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992); Steinberg y Hershberger, *Biochim. et Biophys. Acta*, 342: 195-206 (1974)). Los trabajos pioneros de purificación de IgG a partir de plasma usando lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridima (nombre USAN y denominado en este documento lactato de etacridina y también conocido con los nombres ETHODIN™ o RIVANOL™), un tinte catiónico altamente aromático, lo presentan Horsjisi y Smetana, *Acta Med. Scand.*, 155: 65 (1956). En la década posterior se produjeron gran cantidad de publicaciones que mostraban la capacidad del lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina para purificar IgG y otras proteínas (Miller, *Nature*, 184: 450 (1959); Steinbuch y Niewiarowski, *Nature*, 186: 87 (1960); Neurath y Brunner, *Experientia*, 25: 668 (1969)) a partir de materiales biológicos, por ejemplo plas-

ma y medios de cultivo. El uso del lactato de etacridina para recuperar anticuerpos y otras proteínas de otras fuentes ya se ha presentado. Véase Tchemov *et al.*, *J. Biotechnol.*, 69: 69-73 (1999); SU 944580 publicado el 28 de Julio de 1982; Franek y Dolnikova, *Biotech-Forum-Eur.*, 7: 468-470 (1990); EP 250288 publicado el 23 de diciembre de 1987; DE3604947 publicado el 20 de agosto de 1987; Rothwell *et al.*, *Anal. Biochem.*, 149: 197-201 (1985); Lutsik y Antonyuk, *Biokhimiya*, 47: 1710-1715 (1982); y Aizenman *et al.*, *Mikrobiol-Zh.*, 69: 72 (1982).

La etapa principal de recuperación de polipéptidos a partir de microorganismos se relaciona en la mayoría de los casos con la retirada de material sólido, por ejemplo células y restos celulares. Es importante reconocer la necesidad de separar el producto deseado de los componentes presentes en el medio acondicionado con el que interacciona específicamente. Cuando la proteína de interés está cargada positivamente, tenderá a unirse a cualquier molécula cargada negativamente presente, haciendo de este modo la purificación de la proteína mediante los métodos tradicionales muy difícil. La retirada adicional de la proteína soluble contaminante de los extractos microbianos en bruto, por ejemplo homogenado de *E. coli*, durante esta etapa simplificará las posteriores etapas cromatográficas. Dicha retirada adicional sería especialmente valiosa para la producción a escala industrial, dando como resultado un tamaño de columna de cromatografía y períodos de producción reducidos.

### Sumario de la invención

La invención que implica la purificación es como se reivindica.

Especificamente, en un aspecto, la invención proporciona un método para purificar un polipéptido heterólogo deseado a partir de caldo u homogenado de fermentación microbiana en el que se produce y se solubiliza comprendiendo añadir al caldo u homogenado una cantidad eficaz de una solución de lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina (lactato de etacridina) para precipitar impurezas de las células hospedadoras en condiciones en las que la mayor parte del polipéptido permanece soluble y separar el polipéptido deseado del caldo u homogenado, como se define en las reivindicaciones.

Además, se describe una fermentación de caldo u homogenado de células microbianas que comprende lactato de etacridina y un polipéptido heterólogo para las células.

La adición de lactato de etacridina como agente de precipitación da como resultado inesperadamente una drástica retirada del resto del hospedador incluyendo proteínas del hospedador. En este proceso, la mayoría de las proteínas del hospedador se recuperarán en un precipitado junto con los restos celulares y el polipéptido se recupera en el sobrenadante aclarado. La pureza mejorada del extracto aclarado cuando se usa lactato de etacridina da como resultado una reducción del volumen de los medios o resina cromatográficos requeridos para las columnas, reduciendo de este modo la escala necesaria para la posterior purificación. Esto también da como resultado la eliminación de alguna etapa o etapas cromatográficas, lo que mejora el tiempo de procesamiento y el coste. Además, el proceso en este documento da como resultado un suministro estable y puede funcionar a pH neutro.

### 40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la construcción de los plásmidos antiCD18 F(ab')<sub>2</sub>(-cremallera de leucina), pS1130 (promotor sencillo) y pxC18-7T3 (promotor doble).

La Figura 2 representa la secuencia de ácido nucleico insertada (denominada como Anti-CD18-7T3.ADN; SEC ID Nº 1) de la construcción de promotor doble pxC18-7T3.

Las Figuras 3A y 3B representan las secuencias de aminoácidos (denominadas en las combinaciones como Anti-CD18-7T3.Proteína) codificadas por las dos unidades traduccionales dentro de la construcción pxC18-7T3 (SEC ID Nº 2 y 3) denominadas STII + AntiCD18 cadena ligera (Fig. 3A) y STII + AntiCD18 cadena pesada (Fig. 3B), respectivamente. Las secuencias señal de secreción de STII N-terminal están subrayadas.

La Figura 4 es un esquema de los plásmidos del factor IgG1 anti-Tisular paTF130 (promotores *phoA/phoA*) y pxF-7T3FL (promotores *phoA/tacII*).

La Figura 5 representa la secuencia de ácido nucleico insertada (denominada Anti-TF-7T3FL.ADN; SEC ID Nº 4) de la construcción del promotor *phoA/tacII* pxF-7T3FL.

Las Figuras 6A y 6B representan la secuencia de aminoácidos (denominadas en las combinaciones Anti-TF-7T3FL.Proteína) codificada por las dos unidades traduccionales dentro de la construcción pxF-7T3FL (SEC ID Nº 5 y 6) denominadas STII + Anti-TF cadena ligera (Fig. 6A) y STII + Anti-TF cadena pesada (Fig. 6B), respectivamente. Las secuencias señal de secreción de STII N-terminal se subrayan.

La Figura 7 representa la estructura química de lactato de etacridina.

Las Figuras 8A-8C muestran un análisis de gel teñido con azul de Coomassie de SDS-PAGE no reducido de los sobrenadantes libres después de la precipitación con lactato de acridina. La precipitación se realizó a diferentes valores de pH, como se indica en cada pista. Las pistas marcadas con una X son el sobrenadante aclarado del homogenado

de *E. coli* respectivo, es decir Anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, anti-TF F(ab')<sub>2</sub> y anti-TF de longitud completa (Figs. 8A, 8B y 8C, respectivamente). Los homogenados se diluyeron 4 veces con una solución de lactato de etacridina al 0,8%, es decir una concentración final de lactato de etacridina al 0,6% en cada experimento. Todas las muestras se compensaron en volumen antes de introducirlas en el gel. De hecho, la intensidad de las bandas debe ser comparable al extracto (X) si se obtiene una recuperación del 100%. Las flechas indican la banda del producto. Las Fig. 9A-9C muestran un análisis de gel teñido con azul de Coomassie de SDS-PAGE no reducido de los sobrenadantes después de la precipitación con lactato de etacridina. La precipitación se realizó con diferentes concentraciones de lactato de etacridina, como se indica en cada pista. Las pistas marcadas con una X son los sobrenadantes clarificados del homogenado de *E. coli* respectivo, es decir anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, anti-TF F(ab')<sub>2</sub> y anti-TF de longitud completa (Fig. 9A, 9B y 9C respectivamente). El pH de anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, anti-TF F(ab')<sub>2</sub> y anti-TF de longitud completa era de 8,5, 7,5 y 6,0, respectivamente. La conductividad en las muestras era de  $3,2 \pm 0,2$  mS/cm. Todas las muestras se compensaron en volumen antes de introducirlas en el gel. De hecho, la intensidad de las bandas debe ser comparable al extracto (X) si se obtiene una recuperación del 100%. Las flechas indican la banda del producto.

Las Figuras 10A y 10B muestran un análisis de gel teñido con azul de Coomassie de SDS-PAGE no reducido de dos sobrenadantes después de la dilución con agua o con lactato de etacridina respectivamente. La precipitación se realizó a diferentes niveles de conductividad. El homogenado de *E. coli* que contenía anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub> se usó para este estudio. El homogenado se diluyó 4 veces con agua (Fig. 10A) o con una solución de lactato de etacridina al 0,8%, es decir una concentración final de lactato de etacridina del 0,6% en cada experimento (Fig. 10B) y el pH se ajustó a 8,3. Para alterar la conductividad, se añadió NaCl a las muestras a diferentes concentraciones de 0-400 mM (como se indica en las figuras). Las flechas indican la banda de producto.

La Figura 11 muestra un gráfico de solubilidad de lactato de etacridina a concentraciones de cloruro sódico en aumento. Las muestras se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente antes de que la concentración de lactato de etacridina soluble se determinara. Las llaves abiertas simbolizan la solución de lactato de etacridina al 1,2% y las llaves cerradas la solución al 0,6%. La línea continua es la solución de lactato de etacridina al 0,6% y pH 6,0, la línea discontinua es la solución de lactato de etacridina al 1,2% a pH 6, la línea de puntos es la solución de lactato de etacridina al 0,6% a pH 9 y la línea discontinua con puntos es la solución de lactato de etacridina al 1,2% a pH 9.

Las Figuras 12A-12C muestran un análisis de gel teñido con azul de Coomassie de SDS-PAGE no reducido de tres sobrenadantes después de la precipitación con lactato de etacridina. La precipitación se realizó a temperaturas elevadas. Las pistas marcadas con una X son el sobrenadante aclarado del homogenado de *E. coli* respectivo, es decir anti-CD18 (F(ab')<sub>2</sub>), anti-TF (F(ab')<sub>2</sub>) y anti-TF de longitud completa (Figs. 12A, 12B y 12C respectivamente). El homogenado se diluyó 4 veces hasta una concentración de lactato de etacridina final del 0,6% y el pH se ajustó a 8,5, 7,5 y 6,0 para anti-CD18 (F(ab')<sub>2</sub>), anti-TF (F(ab')<sub>2</sub>) y anti-TF de longitud completa respectivamente. La temperatura y tiempo de incubación se indican en las figuras. Las flechas indican la banda de producto.

La Figura 13 muestra un gráfico de turbidez en función del tiempo para tres sobrenadantes diferentes. Los sobrenadantes de homogenado anti-CD18 tratados con lactato de etacridina al 0,6% se representan mediante círculos llenos (4°C) o círculos vacíos (21°C) y la muestra tratada con PEI al 0,2% se muestra como cuadrados llenos (4°C) y cuadrados vacíos (21°C). Un sobrenadante recuperado a partir de un homogenado anti-CD18 aclarado que se había diluido con agua antes de la concentración se muestra como triángulos llenos (4°C) y triángulos vacíos (21°C). En todos los casos el homogenado antiCD18 se diluyó 4 veces y el pH era de 7,2.

#### 45 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

##### Definiciones

La expresión “caldo u homogenado de fermentación microbiana” se refiere a caldo, pasta o extracto, preferiblemente resuspendido, obtenido a partir de microorganismos, incluyendo levaduras, hongos y procariotas tales como bacterias, que se cultivan y que consumen nutrientes, sin importar que recipiente de cultivo se utilice, por ejemplo un matraz de agitación o fermentador. Preferiblemente el caldo u homogenado es a partir de levaduras o procariotas. Más preferiblemente, el caldo u homogenado es de bacterias. En este documento se prefiere el homogenado. En algunos casos si la solución tiene una conductividad muy alta puede preferirse recoger las células y resuspenderlas, pero en otros casos, se prefiere que el uso del homogenado como está directamente a partir del fermentador. Los componentes del caldo u homogenado incluyen restos celulares, proteínas de la célula hospedadora, ADN, ARN, etc. De este modo, la adición del lactato en este documento conduce a la precipitación selectiva de proteínas de la célula hospedadora, etc., dando un mejor poder de purificación que sin usar el lactato.

La expresión “en condiciones en la que la mayoría del polipéptido permanece soluble” se refiere a la adición de lactato de etacridina al caldo u homogenado en cantidades y a una temperatura y nivel de conductividad que previenen que la mayor parte del polipéptido diana precipite del caldo u homogenado. Preferiblemente, dichas condiciones previenen que precipite más de aproximadamente el 60% del polipéptido, más preferiblemente más de aproximadamente el 70%, aún más preferiblemente más de aproximadamente el 75%, y aún más preferiblemente más de aproximadamente el 80%, aún más preferiblemente más de aproximadamente el 85% y aún más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, aún más preferiblemente más de aproximadamente el 90% y lo más preferiblemente más de aproximadamente el 95%. Este grado de solubilidad se mide mediante un ensayo apropiado, tal como por ejemplo RP-HPLC, cromatografía de afinidad, ELISA, RIA y una combinación de SDS-PAGE y cromatografía de afinidad en alta resolución

(HPAC). La elección del ensayo depende de factores tales como el tipo de célula hospedadora usada y el polipéptido producido.

Las “bacterias” para los fines de este documento incluyen eubacterias y arqueobacterias. Se prefieren las eubacterias, incluyendo bacterias gram positivas y gram negativas. Se prefieren más las bacterias gram negativas. Un tipo de bacteria preferido es *Enterobacteriaceae*. Los ejemplos de bacterias que pertenecen a *Enterobacteriaceae* incluyen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. Otros tipos de bacterias adecuadas incluyen *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, y *Paracoccus*. En este documento se prefiere *E. coli*. Los hospedadores de *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B y *E. coli* X 1776 (ATCC 31.537). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes, y se prefiere W3110. También pueden emplearse células mutantes de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente. Por supuesto es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* de forma adecuada como el hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Véase a continuación en referencia a los ejemplos de células hospedadoras bacterianas adecuadas.

Como se usa en este documento, las expresiones “célula”, “línea celular”, “cepa”, y “cultivo celular” se usan de forma intercambiable y todas estas denominaciones incluyen la progenie. De este modo, las palabras “transformante” y “células transformadas” incluyen el sujeto principal células y cultivos derivados de las mismas sin tener en cuenta la cantidad de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se seleccionaba en la célula transformada original. Donde se pretendan denominaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

Como se usa en este documento, “polipéptido” se refiere en general a péptidos y proteínas de cualquier fuente celular que tienen más de aproximadamente 10 aminoácidos. Los polipéptidos “heterólogos” son aquellos polipéptidos extraños para la célula hospedadora que se está utilizando, tales como una proteína humana producida por *E. coli*. Aunque el polipéptido heterólogo puede ser procariota o eucariota, es preferiblemente eucariota, más preferiblemente de mamífero y lo más preferiblemente de ser humano. Preferiblemente, es un polipéptido recombinante o producido de forma recombinante.

El polipéptido se produce y se solubiliza en el caldo de fermentación u homogenado, lo que significa que se prepara en dicho caldo homogenado y ya está en una fracción soluble resultante de la producción o está en una fracción o forma o pasta insoluble que se trata o se pone en contacto con un agente solubilizante tal como un caotropo (por ejemplo, urea o guanidina) o detergente (como dodecil sulfato sódico (SDS)), con o sin un agente reductor (tal como ditiotreitol o beta-mercaptopetanol) para solubilizarlo. “Soluble”, “solubilizado”, “solubilización”, “disuelto”, o “disolución” en el sentido en que se usan en este documento significan que el polipéptido está en el sobrendante en lugar de en la fracción sólida después del centrifugado. La precipitación o el grado de solubilidad pueden determinarse, por ejemplo, mediante los ensayos apropiados como se ha indicado anteriormente.

Los ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen moléculas tales como, por ejemplo, resina, una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la glándula tiroideas; lipoproteínas; 1-antitripsina; cadena de la insulina A; cadena de la insulina B; proinsulina; trombopoyetina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIC, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anti-coagulación tales como la Proteína C; factor natriéutico atrial; tensioactivo pulmonar, un activador del plasminógeno tal como uroquinasa o urina humana o activador de plasminógenos del tipo tisular (t-PA) y variantes del mismo tal como RETEVASE™ y TNKASE™; bombesina; trombina; factor del crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; anticuerpos para el dominio o dominios ErbB2 tales como 2C4 (documento WO 01/00245; hibridoma ATCC HB-12697), que se une a una región en el dominio extracelular de ErbB2 (por ejemplo, uno o más restos cualesquiera en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 584 de ErbB2, ambos inclusive), encefalinasa; una albúmina del suero tal como albúmina del suero humano; sustancia inhibidora de Muellerian; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores del crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico obtenido del cerebro (BDNF), neurotrófina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor del crecimiento nervioso tal como NGF; cardiotrofinas (factor de hipertrofia cardíaca) tal como cardiotrofina-1 (CT-1); factor de crecimiento obtenido de plaquetas (PDGF); factor de crecimientos de los fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-3 o TGF-5; factor de crecimiento similar a insulina I y II (IGF-1 e IGF-2); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-9; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogénica del hueso (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, beta y gamma; albúmina del suero, tal como albúmina del suero humano (HSA) o albúmina del suero bovina (BSA); factores estimulantes de la colonia (CSF) por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; anticuerpo anti-HER-2; ligando Apo2; superóxido dismutasa; receptores de la célula T; proteínas de la membrana de la superficie; factor acelerador de la descomposición; antígeno viral tal como por ejemplo una porción

de la envuelta del SIDA; proteínas de transporte; receptores del blanco; adresinas; proteínas reguladoras; anticuerpos y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Los polipéptidos preferidos en este documento incluyen albúmina del suero humano (HSA), 2C4, factor tisular, 5 factor anti-tisular, anti-CD20, anti-HER-2, heregulina, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18, VEGF y receptores y anticuerpos para ellos tales como rhuFab V2 y AVASTIN<sup>TM</sup>, hormona del crecimiento y sus variantes, tales como hGH, receptores de la hormona del crecimiento, proteína liberadora de la hormona del crecimiento (GHRP), LIV-1 (EP 1.263.780), TRAIL, factor de necrosis tumoral (TNF) y anticuerpos para el mismo, receptor del TNF y anticuerpos relacionados, IgG receptora de TNF, factores asociados al receptor de TNF (TRAF) e inhibidores para los mismos, 10 factor VIII, dominio B del factor VIII, interferones tales como interferón gamma, factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-beta, anti-TGF tales como anti-TGF beta, activina, inhibina, anti-activina, anti-inhibina, activador del plasminógeno tisular y sus variantes tales como t-PA, RETEPLASE<sup>TM</sup>, y TNKasa, anticuerpos anti-Fas, ligando Apo-2; inhibidor del ligando Apo-2; receptor de Apo-2, Apo-3, factores apoptóticos, Ced-4, DcR3, receptor 15 de la muerte y anticuerpos agonistas (DR4, DR5), linfotoxina (LT), prolactina, receptor de prolactina, proteínas SOB, WISP (proteínas secretadas inducidas por wnt), neurotoxina-3 (NT-3), factor de crecimiento nervioso (NGF) y anti-NGF, ADNasa, antígeno de la hepatitis, antígeno del herpes simplex, leptina, factores de crecimiento similares a insulina (IGF) tales como IGF-1 e IGF-2 y sus proteínas de unión y receptores tales como IGFBP-1-IGFBP-6, insulina, factores del crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como FGF-17, proteína Toll, ligandos TIE, CD40 y anti-CD40, 20 inmunoadhesinas, subtilisina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), trombopoyetina (TPO), interleuquinas tales como IL-2, IL-12, IL-17, IL-22, IL-8, IL-9 y anticuerpos para las mismas y antígeno del cáncer específico para la próstata (PSCA).

Los ejemplos de anticuerpos que se unen a HER2 incluyen 4D5, 7C2, 7F3 y 2C4, así como variantes humanizadas 25 de los mismos, incluyendo huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4DS-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos N° 5.821.337; y los 30 mutantes 2C4 humanizados N° 560, 561, 562, 568, 569, 570, 571, 574 ó 56896 como se describe en el documento WO01/00245. 7C2 y 7F3 y las variantes humanizadas de los mismos se describen en el documento WO98/17797.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 incluyen: "C2B8" que se denomina actualmente "Rituximab" ("RITUXAN<sup>®</sup>") (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); el anticuerpo de ratón 2B8 marcado con itrio-[90]-denominado "Y2B8" (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); la IgG2a de ratón "B1" marcada opcionalmente con <sup>131</sup>I para generar el anticuerpo "<sup>131</sup>I-B1" (BEXXAR<sup>TM</sup>) (Patente de Estados Unidos N° 5.595.721); el anticuerpo monoclonal de ratón "1F5" (Press *et al.*, *Blood*. 69(2): 584-591 (1987)); el anticuerpo "2H7 químérico" (Patente de Estados Unidos N° 5.677.180); y los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o UN-B2 disponibles de la International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, In: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

Los polipéptidos más preferidos son 2C4, factor anti-tisular, anti-CD20, anti-HER-2, heregulina, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF tal como rhuFab V2, hGH, GHRP, LIV-1, TRAIL, anticuerpos para TNF y para el receptor TNF y anticuerpos relacionados, inhibidores de TRAF, IgG receptora de TNF, factor VIII, dominio B del factor VIII, interferón-gamma, TGF-beta y anti-TGF-beta, activina, inhibina, antiactivina, anti-inhibina, t-PA, TNKasa, anticuerpos anti-Fas, ligando Apo-2, inhibidor del ligando Apo-2; receptor de Apo-2, Apo-3, DcR3, receptor de muerte y anticuerpos agonistas (DR4, DR5), linfotoxina (LT), prolactina, receptor de prolactina, WISP, anti-NGF, NGF, NT-3, anti-IL-8, anti-IL-9, IL-17, IL-22, ADNasa, GHRP, antígeno de la hepatitis, antígeno de herpes simplex, leptina, IGF-1, IGFBP 1-6, insulina, FGF-17, proteína Toll, ligandos TIE, CD40, inmunoadhesinas, sub-tilisina, HGF y TPO.

Los polipéptidos aún más preferidos son 2C4, factor anti-tisular, anti-CD20, anti-HER-2, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF tales como rhuFab V2, hGH, LIV-1, TRAIL, anticuerpos para TNF y para el receptor de TNF y anticuerpos relacionados, IgG receptora de TNF, factor VIII, dominio B del factor VIII, interferón-gamma, 50 TGF-beta, activina, inhibina, anti-activina, anti-inhibina, t-PA, TNKasa, ligando Apo-2, inhibidor del ligando Apo-2; receptor de Apo-2, Apo-3, DcR3, receptor de muerte y anticuerpos agonistas (DR4, DR5), WISP, inhibidores de TRAF, anti-NGF, NGF, NT-3, anti-IL-8, anti-IL-9, IL-17, IL-22, anti-TGF, DNasa, GHRP, antígeno de la hepatitis, antígeno del herpes simplex, leptina, IGF-1 e IGFBP 1-6, insulina, FGF-17, proteína Toll, ligandos TIE, anti-CD40, HGF y TPO.

Los polipéptidos particularmente preferidos son polipéptidos recombinantes, más preferiblemente anticuerpos, 55 que incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpo humanizados. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos. Más preferiblemente estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados. Estos incluyen, por ejemplo, los polipéptidos particularmente preferidos 2C4, factor Fab'2 anti-tisular y de longitud completa, anti-CD20, anti-HER2, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18 Fab'2 y de longitud completa, anti-VEGF de longitud completa y rhuFab V2, LIV-1, DR4, DR5 y TRAIL.

Aún más preferiblemente el anticuerpo es un anti-IgE, anti-CD18, anti-VEGF, factor anti-tisular, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40, o anti-CD 11 a. Los fragmentos de anticuerpo abarcados dentro de las definiciones de 60 polipéptido comprenden preferiblemente una cadena ligera, más preferiblemente una cadena ligera kappa. Dichos fragmentos preferidos incluyen por ejemplo un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o F(ab')<sub>2</sub>-cremallera de leucina (LZ) en fusión, y más preferiblemente son F(ab')<sub>2</sub>. Los anticuerpos más preferidos son anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, factor anti-tisular F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpo del factor anti-tisular de longitud completa y anticuerpo anti-VEGF.

El término “anticuerpo” en este documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

5 La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homólogos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por causa de posibles mutaciones de origen natural que pueden presentarse en cantidades secundarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio 10 antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo ya que 15 se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Koehler *et al.*, *Nature*, 265: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse 20 a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en el documento Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991), y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

25 Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen específicamente anticuerpos “químéricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica a u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos químéricos de interés en este documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable obtenidas de un primate no humano (por ejemplo Cercopitécidos, Simios, etc) y secuencias de región constante humana. Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento o fragmentos de anticuerpos.

35 40 Un anticuerpo “intacto” es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C<sub>L</sub>) y dominios constantes de cadena pesada, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, y C<sub>H</sub>3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de cadena nativa (por ejemplo, dominios constantes de cadena nativa humana) o variantes de secuencias de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

45 50 Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc con variación en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen la unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento, unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de receptores de la superficie celular (receptor de células B; BCR), etc.

55 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes “clases”. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las clases  $\gamma$  y  $\alpha$  se dividen además en subclases 50 en base a las diferencias relativamente secundarias en la secuencia y la función de la C<sub>H</sub>, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulina se conocen bien.

60 65 “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” y “ADCC” ser refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, Células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen al anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan solamente FcRIII mientras que los monocitos expresan FcRI, FcRII y FcRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 del documento de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se describe en el documento Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 652-656 (1998).

65 70 Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), células

Asesinas Naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos prefiriéndose las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de la sangre o de PBMC como se describe en este documento.

5 Los “anticuerpos nativos” son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, aunque la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados a intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman un interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

15 El término “variable” se refiere al hecho de que algunas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye a partes iguales por todos los dominios variables de los anticuerpos. Ésta se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en general una configuración de lámina beta, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman, parte de la estructura de la lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas estrechamente unidas mediante los FR con las regiones hipervariables de la otra cadena, que contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

30 La expresión “región hipervariable” cuando se usa en este documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al anticuerpo. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, los 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 la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). Los restos de la “Región Marco” o “FR” son los restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable como se define en este documento.

45 La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de un antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión al antígeno y que es capaz de reticular el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno completo. Esta región está compuesta por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. De forma colectiva, las seis regiones hipervariables otorgan especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para el antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

55 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab', son diferentes de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en este documento para Fab' en la que el resto o restos de cisteína de los dominios constante tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

65 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

Fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, la cadena polipeptídica Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase el documento Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York, 1994), págs. 269-315. Los fragmentos del anticuerpo scFv anti-ErbB2 se describen en el documento WO93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458.

La expresión “anticuerpos biespecíficos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable ( $V_H$ ) conectado a un dominio ligero variable ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H - V_L$ ). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se describen más completamente en por ejemplo, los documentos EP404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6444-6448 (1993).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas obtenidas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen restos de una región hipervariable en el receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene una especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para afinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá opcionalmente también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse los documentos 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).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con el diagnóstico de los usos terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpo de acuerdo con lo determinado por el método de Lowry y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se prepara por al menos una etapa de purificación.

Una “cremallera de leucina” es un péptido (a menudo de aproximadamente 20-40 restos de aminoácidos de longitud) que tiene varios aminoácidos que se repiten, en el que cada séptimo aminoácido es un resto de leucina. Dichas secuencias de cremallera de leucina forman alfa-hélices anfipáticas, con los restos de leucina alineados sobre el lado hidrófobo para la formación de dímeros. Los ejemplos de cremalleras de leucina en este documento incluyen la cremallera de leucina Fos-Jun (O’Shea *et al.*, *Science*, 245: 646 (1989)), que puede usarse para formar heterodímeros (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos); la cremallera de leucina GCN4 de levaduras (Landschulz *et al.*, *Science*, 240: 1759-1764 (1988)) que puede usarse para formar heterodímeros (por ejemplo, anticuerpos monoespecíficos); y las cremalleras de leucina descubiertas en otras proteínas de unión al ADN, tales como C/EBP y c-myc así como variantes de cualquiera de estas.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma operativa en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las bacterias incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma.

Un ácido nucleico está “unido de forma operativa” cuando se coloca en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretor se une de forma operativa al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor se une de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une de forma operativa a una secuencia codificante si está colocado de modo que facilite la traducción. En general, “unido de forma operativa” significa que las secuencias de ADN que estén unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. La unión se realiza, por ejemplo, mediante el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existieran, se usan los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o los enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

El término “recuperación” de un polipéptido significa generalmente obtener el polipéptido libre de las células en las que se produjo.

“Impurezas de la célula hospedadora” significan proteínas hospedadoras contaminantes y otras impurezas moleculares tales como ADN y restos celulares en el caldo u homogenado de fermentación.

### Modos de realizar la invención

La invención proporciona en un aspecto un método para purificar un polipéptido heterólogo deseado a partir de un caldo u homogenado de fermentación microbiano en el que se produce y solubiliza. El polipéptido también puede producirse en una fracción soluble o puede ser insoluble (por ejemplo, producido en una fracción, fase o forma insoluble) y por lo tanto se pone en contacto o se trata para disolver el polipéptido. Si el polipéptido se produce en estado insoluble, se solubiliza mediante exposición a o puesta en contacto con un agente solubilizante (como se ha indicado anteriormente) antes de añadir el lactato de etacridina, por ejemplo, añadiendo dicho agente a una fracción que contiene el polipéptido insoluble. Se prefiere que el polipéptido ya esté en fracción soluble. El método en este documento implica añadir al caldo u homogenado una cantidad eficaz de una solución de lactato de etacridina para precipitar las impurezas de la célula hospedadora contenidas en el caldo u homogenado. Dicha adición tiene lugar en condiciones en las que la mayor parte del polipéptido permanece soluble. En la siguiente etapa el polipéptido deseado se separa del caldo u homogenado, incluyendo restos celulares, proteínas de la célula hospedadora, ADN, ARN, etc.

Puesto que la mayor parte de las proteínas hospedadoras que precipitaron mediante el lactato de etacridina tienen una carga negativa mientras que el polipéptido diana tiene una carga superficial positiva, se prefiere que el polipéptido diana tenga un pI mayor que el pI medio de las proteínas hospedadoras contenidas en las impurezas de la célula hospedadora, de modo que puedan retirarse en el sobrenadante de las proteínas hospedadoras precipitadas. Dicho pI medio puede determinarse mediante un gel 2-D de las proteínas hospedadoras, en el que, por ejemplo la banda de pI varía entre aproximadamente 7,5 y 5,0, siendo la media de 6,25. Como alternativa, el isoelectroenfoque en solitario (que es la primera dimensión en un gel 2-D) puede usarse para esta determinación, así como el enfoque cromatográfico y cálculos mediante la composición de aminoácidos. Los polipéptidos más preferidos son aquellos que tienen un pI de al menos aproximadamente 7 y preferiblemente de aproximadamente 7-10.

Los polipéptidos preferidos a emplear se han mostrado anteriormente.

La concentración de lactato de etacridina empleada depende, por ejemplo, de la cantidad de cargas negativas en la solución, que están en la superficie de la mayor parte de las impurezas de la célula hospedadora presentes en la solución. De hecho, la concentración de lactato de etacridina depende al menos de la cantidad de impurezas de la célula hospedadora tales como ADN y de la concentración de proteína hospedadora en la solución. Cuanto mayor sea la concentración de proteína hospedadora y ADN en el homogenado, mayor será la cantidad de lactato de etacridina requerida. De hecho, cuantos más componentes cargados negativamente estén disponibles para formar complejo con el lactato de etacridina y por lo tanto para precipitar, mayor será la cantidad de lactato de etacridina necesaria para maximizar la precipitación. La concentración preferida de lactato de etacridina es generalmente de más de aproximadamente el 0,1% en peso/volumen. Se prefiere más una concentración de lactato de etacridina de aproximadamente el 0,1-5%, aún más preferida de aproximadamente el 0,4-5% y lo más preferiblemente de aproximadamente el 0,6-5% de peso/volumen.

En general, cuanto menor sea la conductividad de la solución cuando se realiza la precipitación, más eficaz será la purificación del polipéptido de los restos celulares y del ADN. La conductividad puede controlarse, por ejemplo, mediante la cantidad de sal en el homogenado o caldo o diluyendo el homogenado o caldo con agua u otro disolvente adecuado. Se prefiere que la conductividad del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina sea de menos de aproximadamente 15 miliSiemens (mS), más preferiblemente de aproximadamente 1-15 mS, aún más preferiblemente de aproximadamente 1-10 mS y más preferiblemente de aproximadamente 1-5 mS.

La conductividad de la solución durante la precipitación dependerá al menos en parte del tipo de sal presente en su interior. Los haluros (por ejemplo, cloruros o bromuros) no son aniones preferidos para las sales, pero si están presentes, lo están preferiblemente a una concentración de menos de aproximadamente 100 mM en solución antes de añadir el lactato de etacridina y por debajo de aproximadamente 50 mM una vez que se ha añadido el lactato de etacridina. Algunas sales ejemplares para emplear en este documento incluyen sales de tampón, TRIS, MES, MOPS, acetato y citrato. La concentración de sales presentes no debe estar por encima de una cantidad que haría precipitar al lactato de etacridina. La cantidad exacta depende principalmente del tipo de sal y de la estequiometría entre la sal y el lactato de etacridina y el límite está en el extremo inferior de la estequiometría, es decir, el extremo más bajo indica más sal en relación con el lactato de etacridina.

El pH del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina depende por ejemplo, del pI del polipéptido, la cantidad de cargas de superficie negativas en el polipéptido, la cantidad de impurezas de la célula hospedadora en la solución y la concentración de lactato de etacridina. El pH preferiblemente no es superior al pI del polipéptido. Generalmente, el intervalo de pH es de aproximadamente 4-10; sin embargo, para una precipitación de las impurezas de la célula hospedadora eficaz, el pH del caldo o del homogenado después de la adición del lactato de etacridina preferiblemente no es superior a aproximadamente 9, ya que el lactato de etacridina se vuelve menos cargado por encima de este pH, con el intervalo preferido de aproximadamente 4-9. Más preferiblemente el pH del caldo del

homogenado después de la adición del lactato de etacridina es de aproximadamente 5-9 y aún más preferiblemente de aproximadamente 6-9. Cuantas más cargas superficiales negativas en el polipéptido, menor será el pH dentro de este intervalo, con un intervalo preferido de dichos polipéptidos de aproximadamente pH 6-7.

5 El caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina se incuba opcionalmente a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo. Si se eleva la temperatura y durante cuento tiempo, depende de muchos factores incluyendo el tipo de polipéptido de interés, qué modificaciones, si es que hay alguna, se producen en el polipéptido de interés si se expone a temperatura elevada durante este periodo en el proceso, etc. Por ejemplo, para la purificación 10 del factor anti-tisular F(ab')<sub>2</sub>, se prefieren temperaturas elevadas, mientras que para el anticuerpo de longitud completa, es preferible no tener calor o tener temperaturas no superiores a aproximadamente 25°C. Teniendo en cuenta estos factores, en general, la temperatura del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina varía entre 15 aproximadamente temperatura ambiente y aproximadamente 70°C, más preferiblemente, entre aproximadamente temperatura ambiente y aproximadamente 65°C manteniéndose durante aproximadamente 1-60 minutos. Si debe elevarse la temperatura, un intervalo preferido es de aproximadamente 50 a 65°C manteniéndose durante aproximadamente 1-60 minutos.

Además, se describe una composición de material que es un caldo u homogenado de fermentación a partir de 20 células microbianas que comprende lactato de etacridina y un polipéptido heterólogo. Se contempla que el polipéptido se disuelva en dicho caldo u homogenado. Las células, polipéptidos, concentración, y condiciones para el caldo u homogenado son como se han indicado anteriormente. El grado de disolución del polipéptido puede determinarse mediante un ensayo apropiado tal como los ensayos que se han indicado anteriormente. Los parámetros de cultivo se usan y la producción del polipéptido se realiza de manera convencional, tal como en los procedimientos que se describen a continuación.

25 A. *Selección del Ácido Nucleico y Modificaciones del Mismo*

Aunque el polipéptido en este documento, tal como un anticuerpo, puede producirse a partir de cualquier fuente (por ejemplo, escisión peptídica de anticuerpos intactos), preferiblemente se prepara de forma recombinante. El 30 ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés es ARN, ADNc o ADN genómico de cualquier fuente que sea adecuada, siempre que codifique el polipéptido o polipéptidos de interés. Se conocen bien métodos para seleccionar el ácido nucleico apropiado para la expresión de polipéptidos heterólogos (incluyendo variantes de los mismos) en hospedadores microbianos. La selección del ácido nucleico apropiado para preparar polipéptidos no de anticuerpo en cultivo de células microbianas se conoce bien en la técnica.

35 Si se producen anticuerpos monoclonales, se aísla fácilmente el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de ratón). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transforman en las células hospedadoras microbianas de este documento para obtener 40 la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican los anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

45 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en su interior a partir de una fuente que no es humana. Dichos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se toman típicamente a partir de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-50 327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las secuencias de la región hipervariable. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en las que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

55 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método "del mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanos conocidos. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta después como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco particular obtenida de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Puede usarse el mismo marco para diferentes anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

60 Además es importante que los anticuerpos se humanicen con la conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los 65

anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los especialistas en la técnica. Existen disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales probables de tres dimensiones de las secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del posible papel de los restos en la función de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir el análisis de los restos que influirán en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos FR del receptor y secuencias de importación de modo que se consigan las características del anticuerpo deseado, tales como una afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directa y más sustancialmente en la influencia de la unión a antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o del anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente o agentes diana para generar un inmunoconjunto. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células hospedadoras. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el especialista en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) (documento WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos Nº 5.571.894 y 5.587.458). El fragmento de anticuerpos también puede ser un “anticuerpo lineal”, por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficas o biespecíficas.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína Dkk-1. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o a fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes y se co-transfieren en un organismo hospedador bacteriano adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando las proporciones no iguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o los tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas a proporciones iguales da como resultado rendimientos altos cuando las proporciones no son de significación particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura simétrica facilita la separación del componente biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunglobulina no deseada, así como la presencia de la cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica posibilita una vía fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, el documento Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.731.168, el interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo de células recombinantes. El interfaz preferido comprende al menos una parte del dominio de C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos del interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales mayores, (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a las cadenas más grandes en el interfaz de la segunda molécula de anticuerpos sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos más grandes con otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímeros con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjungados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjunto puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980),

y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

5 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante del ditiol, arsenito de sodio para estabilizar los ditioles cercanos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos de  $Fab'$  generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de  $Fab'$ -TNB se reconvierte después en el  $Fab'$ -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de  $Fab'$ -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

10 15 Adicionalmente, pueden recuperarse directamente fragmentos  $Fab'$ - SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (*Shalaby et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)).

20 25 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina (*Kostelny et al.*, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992)). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unen a las porciones  $Fab'$  de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se reducen en la región bisagra para formar monómeros y después se vuelven a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros 30 del anticuerpo. La tecnología "de anticuerpo biespecífico" descrita por *Hollinger et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para la preparación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para formar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv) (*Gruber et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)).

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

40 45 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de polipéptidos se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucléotidos (o sitio dirigida), mutagénesis por PCR, o mutagénesis de cassetes de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del polipéptido.

50 55 Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la unión al receptor Fc. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de puentes disulfuro intercatenarios en esta región.

60 Para aumentar la vida media del suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítopo de unión al receptor de tipo silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en este documento, la expresión "epítopo de unión al receptor de tipo silvestre" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) que es responsable del aumento de la vida media en el suero *in vivo* de la molécula de IgG.

65 En este documento se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

#### B. Inserción del Ácido Nucleico en un Vector Replicable

70 75 80 85 90 95 El ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) se inserta de forma adecuada en un vector replicable para la expresión en el microorganismo bajo el control de un promotor adecuado. Muchos vectores están disponibles para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y de la célula hospedadora particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de la célula hospedadora particular con la que es compatible. Dependiendo del tipo particular de hospedador, los componentes del vector incluyen generalmente, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plásmidos que contienen replicones y secuencias de control que se obtienen de especies compatibles con la célula hospedadora junto con hospedadores microbianos. El vector normalmente tiene un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido obtenido de una especie 5 de *E. coli* (véase por ejemplo, *Bolivar et al., Gene*, 2: 95 (1977)). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y proporciona por lo tanto un medio fácil para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, u otro plásmido bacteriano o fago, también contiene generalmente o se modifica para que contenga, promotores que pueden usarse por el hospedador para la expresión de los genes marcadores seleccionables.

10 (i) *Componente de Secuencia Señal*

El ADN que codifica el polipéptido de interés de este documento puede expresarse no solamente de forma directa, sino también en forma de una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N del polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser 15 un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que se reconozca y se procese (es decir, que se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora.

20 Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal polipeptídica nativa o eucariota, la secuencia señal puede sustituirse por una secuencia de señal procariota seleccionada por ejemplo, entre el grupo compuesto por los líderes lamB, ompF, fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levaduras la secuencia señal puede ser por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder 25 del factor alfa (incluyendo líderes del factor de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de glucomamilasa de *C. albicans* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990.

ii) *Origen del Componente de Replicación*

30 Los vectores de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias se conocen bien para diversos microbios. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativa tales como *E. coli*.

iii) *Componente de Selección Génica*

35 Los vectores de expresión contienen generalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de las células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Este marcador seleccionable es diferente 40 de los marcados genéticos que se utilizan como se define en esta invención. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotrofias diferentes de las provocadas por la presencia del(los) marcado-re(s) genéticos o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

45 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para interrumpir el crecimiento de una célula hospedadora. En este caso, las células que se transforman con éxito con el ácido nucleico de interés producen un polipéptido que otorgan resistencia al fármaco y de este modo sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina (*Southern et al., J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327 (1982)), ácido 50 micofenólico (*Mulligan et al., Science*, 209: 1422 (1980) o higromicina (*Sugden et al., Mol. Cell. Biol.*, 5: 410-413 (1985)). Los tres ejemplos dados anteriormente emplean genes bacterianos bajo control eucariota para llevar la resistencia al fármaco G418 o neomicina apropiado (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente.

55 iv) *Componente Promotor*

El vector de expresión para producir el polipéptido de interés contiene un promotor adecuado que es reconocido por el organismo hospedador y se une de forma operativa al ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la beta-lactamasa y la lactosa (*Chang et al., Nature* 275: 615 (1978); *Goeddel et al., Nature*, 281: 544 (1979)), el sistema promotor de la arabinosa (*Guzman et al., J. Bacterial.*, 174: 7716-7728 (1992)), el sistema promotor de la fosfatasa alcalina, un sistema de triptófano (*trp*) (*Goeddel, Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980) y el documento EP 36.776) y promotores híbridos tales como promotor tac (deBoer *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)). Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo a un especialista en la técnica unirlos de forma operativa con el ADN que codifica el polipéptido de interés (*Siebenlist et al., Cell*, 20: 269 (1980)) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar los sitios de restricción requeridos cualesquiera.

# ES 2 287 687 T3

Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida de forma operativa al ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor puede retirarse de la fuente de ADN bacteriano mediante la digestión con enzimas de restricción e insertarse en el vector que contiene el ADN deseado.

5 Los promotores adecuados para su uso en levaduras se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la tres fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosaisomerasa y glucoquinasa.

10 15 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de cultivo, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

## (v) Construcción y Análisis de Vectores

20 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes presentados anteriormente emplea técnicas de ligamiento convencionales. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se adaptan y se ligan de nuevo en la forma deseada para generar el plásmido requerido.

25 Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligamiento se usan para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) u otras cepas y se seleccionan transformantes con éxito mediante resistencia a ampicilina o tetraciclina donde sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan mediante digestión de endonucleasa de restricción y/o se secuencian mediante el método de Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467 (1977) o Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981) o mediante el método de Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980).

## C. Selección y Transformación de Células Hospedadoras

35 Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de este documento son cualquier célula microbiana, incluyendo procariotas y células de hongos, incluyendo levaduras. Los procariotas adecuados para este fin incluyen bacterias como se han definido anteriormente, preferiblemente eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos incluyen *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella* así como *Bacilli* tales con *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales, *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3119 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. También pueden emplearse células mutantes de cualquiera de las cepas mencionadas anteriormente como el hospedador de partida, que después se mutan adicionalmente para que contengan al menos el genotipo mínimo requerido en este documento.

40 45 50 La cepa W3110 de *E. coli* es un hospedador de *E. coli* parental ya que es una cepa hospedadora común para las fermentaciones del producto de ADN recombinante. Los ejemplos de hospedadores de *E. coli* de partida para usar como hospedadores parentales, junto con sus genotipos, se incluyen en la tabla a continuación:

55 Cepa	Genotipo
W3110	K-12 F <sup>-</sup> lambda <sup>-</sup> IN (rmD-rmE)1
1A2	W3110 ΔfhuA
9E4	W3110 ΔfhuA ptr3
27A7	W3110 ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ (argF-lac)169
27C6	W3110 ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ (argF-lac)169 ΔompT
27C7	W3110 ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ (argF-lac)169 ΔompT degP41::kan <sup>R</sup>
33D3	W3110 ΔfhuA ptr3 lacIq lacL8, ΔompT degP41::kan <sup>R</sup>
36F8	W3110 ΔfhuA phoAΔE15 Δ (argF-lac) 169 ptr3 degP41::kan <sup>R</sup> ilvG2096

## ES 2 287 687 T3

41H1	W3110 $\Delta fhuA$ $phoS^*$ (T104) $\Delta$ (argF-lac)169 $degP41::kan^R$ $ptr3$ $ilvG2096$ (Vaf)
43D3	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac)169 $\Delta ompT$ $degP41$ $kan^R$ $ilvG2096$
43H1	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $ptr3$ $\Delta ompT$ $prc::kan^R$ $sprW148R$
43E7	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $\Delta ompT$ $ptr3$ $phoA\Delta E15$ $degP41$ $ilvG2096$
44D6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta$ (argF-lac)169 $degP41::kan^R$ $\Delta ompT$ $ilvG2096$
45F8	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta$ (argF-lac)169 $degP41$ $\Delta ompT$ $phoS^*$ (T10Y) $ilvG2096$
45F9	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $\Delta$ (argF-lac)169 $degP41$ $\Delta ompT$ $ilvG2096$ $phoS^*$ (T10Y) $\Delta cyo::kan^R$
49A5	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA$ $\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $deo$ $C2$ $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $\Delta fucP$ $AmalE$
58B3	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $deoC$ $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $\Delta prc$
58H2	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $ptr3$ $\Delta ompT$ $sprW148R$
58H7	W3110 $\Delta fhuA$ ( $\Delta tonA$ ) $\Delta$ $ptr3$ $\Delta ompT$ $\Delta degP$ $lac$ $lq$ $\Delta lacY$
59A7	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $deoC$ $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $\Delta prc$ $sprW148R$
60H4	W3110 $\Delta fhuA\Delta manA$ $phoA\Delta E15$ $\Delta$ (argF-lac) 169 $deoC2$ $degP41$ $ilvG2096$ (Vaf) $\Delta prc$ $prc$ -supresor
61D6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $lac$ $lq$ $lacL8$ $\Delta ompT$ $\Delta$ (nmpc-fepE) $degP41$
62A7	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3$ $lac$ $lq$ $lacL8$ $\Delta ompT$ $\Delta$ (nmpc-fepE) $degP41$ $ilvG2096$

60 También son adecuados los intermedios para la preparación de la cepa 36F8, es decir, 27B4 (Patente de Estados Unidos N° 5.304.472) y 35E7 (un aislado de colonia resistente a temperatura espontánea que crece mejor que 27B4). Una cepa adecuada adicional es la cepa de *E. coli* que tiene las proteasas periplásmicas mutantes descritas en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.783 expedida el 7 de agosto de 1990.

65 Las cepas anteriores pueden producirse mediante integración cromosómica de la cepa parenteral u otras técnicas, incluyendo las que se presentan en los Ejemplos a continuación.

Los anticuerpos de longitud completa pueden prepararse en *E. coli* de acuerdo con las técnicas del documento WO 02/061090 publicado el 8 de agosto de 2002.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior usado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature* 290: 140 (1981); EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de EE.UU. N° 4.943.529; *Fleer et al., Bio/Technolo* 9: 968-975 (1991)) tales como por ejemplo *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al., J. Bacteriol.* 737 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilaram* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al., Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al., J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 (1979)); *Schwamziomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como por ejemplo *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 (1983); *Tilbourn et al., Gene*, 26: 205-221 (1983); Yelton *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 (1984)) y *A. Niger* (Nelly y Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 (1985)). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en este documento e incluyen, aunque sin limitación, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas de los géneros compuestos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccaromyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras puede encontrarse en el documento C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

El ácido nucleico que codifica al polipéptido se inserta en las células hospedadoras. Preferiblemente, esto se realiza transformando las células hospedadoras con los vectores de expresión descritos anteriormente y cultivándola en medios nutriente modificados según sea apropiado para inducir a los diversos promotores.

Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en la sección 1.82 del documento Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), se usa generalmente para células procariotas u otras células que contienen barreras de la pared celular sustanciales. Otro método para la transformación emplea poletilenglicol/DMSO, como se describe en el documento Chung y Miller, *Nucleic Acids Res.*, 16: 3580 (1988). Las transformaciones en levaduras se realizan típicamente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al., J. Bact.* 130: 946 (1977) y Hsiao *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión del protoplasto de bacterias con células intactas o policationes, por ejemplo polibreno, poliornitina.

#### D. Cultivo en las Células Hospedadoras

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas, incluyendo los medios descritos generalmente por Sambrook *et al., supra*. Los medios que son adecuados para las bacterias incluyen, aunque sin limitación medio AP5, caldo de nutrientes, caldo Luria-Bertani (LB), medio mínimo de Neidhardt y medio mínimo o completo C.R.A.P., más los suplementos de nutrientes necesarios. En realizaciones preferidas, los medios también contienen un agente de selección, seleccionado en base a la construcción del vector de expresión, para permitir de forma selectiva el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el cultivo de células que expresan el gen resistente a ampicilina. También pueden incluirse suplementos necesarios cualesquiera además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico a las concentraciones apropiadas, introducidos en solitario o en forma de mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo compuesto por glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritrol y diotiotreitol.

Los ejemplos de medios adecuados se dan en las patentes de EE.UU. n° 5.304.472 y 5.342.763. Los medios C.R.A.P. limitantes de fosfato están compuestos por 3,57 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,71 g de Citrato de Na-2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura (certificado), 5,36 g de HycaseSF™-Sheffield, pH ajustado con KOH al 7,3, qs hasta 872 ml con SQ H<sub>2</sub>O y autoclavados; enfriados a 55°C y suplementados con 110 ml de MOPS 1 M a pH 7,3, 11 ml de glucosa al 50%, 7 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M). Después puede añadirse carbenicilina al cultivo de inducción a una concentración de 50 µg/ml.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 39°C, más preferiblemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, aun más preferiblemente a aproximadamente 30°C.

Cuando se emplea el promotor de fosfatasa alcalina, las células de *E. coli* usadas para producir el polipéptido de interés de esta invención se cultivan en medios adecuados en los que el promotor de fosfatasa alcalina puede inducirse parcial o completamente como se describe generalmente, por ejemplo, en Sambrook *et al., supra*. El cultivo no debe tener lugar necesariamente nunca en ausencia de fosfato inorgánico o a niveles de agotamiento de fosfato. En primer

lugar, el medio contiene fosfato inorgánico en una cantidad por encima del nivel de inducción de la síntesis de proteínas y suficiente para el crecimiento de la bacteria. A medida que las células crecen y utilizan el fosfato, hacen disminuir el nivel de fosfato en el medio, provocando de este modo la inducción de la síntesis del polipéptido.

5 Si el promotor es un promotor inducible, para que se produzca la inducción, típicamente las células se cultivan, hasta que se alcanza cierta densidad óptica, por ejemplo a  $A_{550}$  de aproximadamente 200 usando un proceso de alta densidad celular, punto en que comienza la inducción (por ejemplo, mediante la adición de un inductor, mediante el agotamiento de un componente del medio, etc.), para inducir la expresión del gen que codifica el polipéptido de interés.

10 También pueden incluirse los suplementos necesarios cualesquiera a concentraciones apropiadas que conocerán los especialistas en la técnica, introducidos en solitario o en forma de mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. El pH del medio puede ser cualquiera entre aproximadamente 5-9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH está preferiblemente entre aproximadamente 6,8 y 15 aproximadamente 7,4 y más preferiblemente en aproximadamente 7,0.

15 Un medio selectivo que puede usarse para cultivar levaduras es un agar de dextrosa completo sintético que carece de uracilo (SCD-Ura) preparado como se describe en el documento *Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994), p. 208-210.

#### 20 E. Detección de la Expresión

25 La expresión del gen puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia de Southern, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)), transferencia en mancha (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias del polipéptido. Pueden emplearse diversas marcas, más comúnmente radioisótopos, particularmente  $^{32}\text{P}$ . Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas, tales como el uso de nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como el sitio para la unión de la avidina o anticuerpos, que pueden marcarse con una amplia variedad de marcas, tales como radionúclidos, fluorescentes, enzimas o similares. Como alternativa, pueden emplearse ensayos o geles para la detección de la proteína.

#### F. Purificación de Polipéptidos

35 Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido en este documento se produce de forma intracelular o en el espacio periplasmático. Si el polipéptido se produce de forma intracelular, como primera etapa, los restos particulados, células hospedadoras o células lisadas (por ejemplo resultantes de la homogeneización), se retiran, por ejemplo mediante centrifugado o ultrafiltración, para producir un caldo u homogenado celular.

40 Después, de acuerdo con esta invención, las impurezas celulares como se han definido anteriormente se retiran del homogenado o caldo mediante precipitación usando lactato de etacridina en las condiciones que se han mostrado anteriormente, y la mezcla resultante se trata de modo que el polipéptido de interés, en forma soluble, se recupera.

45 La separación del polipéptido diana del caldo u homogenado puede realizarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo aquellos bien conocidos en la técnica tales como centrifugado y filtración. Preferiblemente la separación se realiza usando centrifugado o filtración de flujo tangencial, por ejemplo, usando un filtro de aproximadamente 300 kiloDalton a 1 micrómetro.

50 Después de que el polipéptido se ha separado del caldo u homogenado, puede purificarse mediante cualquier medio conocido, incluyendo cromatografía o filtración tal como ultrafiltración/diafiltración o filtración de flujo tangencial. En particular, los siguientes procedimientos, individualmente o en combinación, son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados, con los métodos específicos usados dependiendo del tipo de polipéptido: Cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC), separación de dos fases acuosas (ATPS), fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); cromatografía sobre sílice; cromatografía en una resina de intercambio iónico tal como S-SEPHAROSE<sup>TM</sup> y DEAE; cromatoenfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; ultrafiltración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, y filtración en gel usando por ejemplo, SEPHADEX<sup>TM</sup> G-75.

55 Por ejemplo, como parte del proceso de recuperación general de la proteína, el polipéptido puede exponerse a un reactivo inmovilizado que se une a o modifica el polipéptido. De este modo, el polipéptido puede someterse a cromatografía de afinidad donde un reactivo inmovilizado que se une específicamente al polipéptido, tal como un anticuerpo, captura el anticuerpo y las impurezas pasan a través de la columna de cromatografía de afinidad. El polipéptido puede eluirse posteriormente de la columna cambiando las condiciones de modo que el polipéptido ya no se une al reactivo inmovilizado. El reactivo inmovilizado también puede ser una enzima tal como una proteasa que modifique el polipéptido (Sahni *et al., Anal. Biochem.*, 193: 178-185 (1991) y Voyksner *et al., Anal. Biochem.*, 188: 72-81 (1990)).

60 Otro tipo de proceso de purificación es la filtración. La filtración de contaminantes del tamaño de partícula fina de los fluidos se ha conseguido mediante el uso de diversos medios de filtro poroso a través de los cuales se pasa una composición contaminada de modo que el filtro retiene el contaminante. La retención del contaminante puede

- producirse mediante limitación mecánica o captura y adsorción de partículas electrocinéticas. En la limitación mecánica, una partícula se retiene mediante atrapamiento físico cuando intenta pasar a través de un poro más pequeño que ella misma. En el caso del mecanismo de captura electrocinética, la partícula colisiona con una superficie dentro del filtro poroso y se retiene sobre la superficie mediante fuerzas de atracción de corto alcance. Para conseguir la captura electrocinética, pueden usarse sistemas de modificación de carga para alterar las características de carga superficial de un filtro (véase por ejemplo el documento WO 90/11814). Por ejemplo, cuando los contaminantes a retirar son aniónicos, puede usarse un modificador de carga catiónico para alterar las características de carga del filtro de modo que el contaminante se retenga por el filtro.
- 10 Los anticuerpos monoclonales pueden separarse adecuadamente de los precipitados mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, filtración en gel o electroforesis, diálisis, HIC, cromatografía de afinidad, por ejemplo protein-A SEPHAROSE™, protein-G, cromatografía de afinidad de antígeno o afinidad anti-Ig, homogeneización, aclaramiento por filtración o centrifugado, precipitación, por ejemplo mediante un tratamiento con sulfato de amonio, polietilenglicol o ácido capríflico, cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo usando resinas tales como hidroxiapatita, por ejemplo resinas que contienen fosfato de calcio tales como cerámica-hidroxiapatita y BIOGEL HT™ y resinas de intercambio aniónico que incluyen las que tienen un resto cargado positivamente (a pH neutro), tal como dietilaminoetano (DEAE), polietileneimina (PEI), y aminoetano cuaternario (QAE), por ejemplo la resina Q-SEPHAROSE FAST FLOW™ (Pharmacia), la resina DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW™, la resina DEAE-TOYOPEARL™, la resina QAE-TOYOPEARL™, la resina POROS-Q™, la resina FRACTOGEL-DMAE™, la resina FRACTOGEL EMD-TMAE™, MATREX CELLUFINE DEAE™ y similares. Los métodos para aislar y purificar anticuerpos se describen adicionalmente en el documento "Antibodies: A Laboratory Manual"; Harlow and Lane, eds. (Cold Spring Harbor Laboratories, New York: 1988).

25 En una realización específica, la etapa de recuperación implica exponer el polipéptido solubilizado a una fase sólida en la cual está inmovilizado un reactivo que se une a, o modifica el polipéptido. En una realización, la fase sólida se introduce en una columna y el reactivo inmovilizado capture el polipéptido. En otra realización, el reactivo modifica química y/o físicamente el polipéptido y se inmoviliza sobre la base sólida que se introduce por ejemplo en una columna y la composición se pasa a través de la columna. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender un dominio precursor que retira el reactivo inmovilizado como parte del proceso de recuperación. Por ejemplo, el polipéptido precursor es un anticuerpo con un dominio de dimerización de cremallera de leucina, que se retira mediante pepsina inmovilizada en el proceso de recuperación.

30 En esta realización, la composición que comprende el polipéptido y el reactivo lixiviado (y opcionalmente uno o más contaminantes adicionales) se pasa después a través de un filtro que tiene una carga que es opuesta a la carga del reactivo al pH de la composición, para retirar el reactivo lixiviado de la composición. El filtro puede estar cargado positivamente para retirar contaminantes que estén cargados negativamente al pH de la composición, tales como proteasas ácidas, proteína A, proteína G u otros reactivos que pueden lixiviarse de las columnas de afinidad. Como alternativa, el filtro puede estar cargado negativamente para retirar contaminantes que estén cargados positivamente al pH de la composición, tales como proteasas básicas. Preferiblemente las características de carga del polipéptido de interés en la composición que se pasa a través del filtro son tales que el polipéptido no se retiene significativamente por el filtro y pasa a su través. El filtro puede colocarse "en línea" con el efluente tratado como en la etapa anterior (por ejemplo, el efluente fluye directamente a través del filtro). Esto puede conseguirse conectando el filtro directamente al puerto del efluente de la columna, antes de que se recoja el efluente en un tanque de reserva. El filtro puede regenerarse usando técnicas aplicables al tipo de filtro usado.

45 También se ha usado HIC para purificar fragmentos de anticuerpo. Véase por ejemplo el documento *Protein Engineering*, págs. 6, 8 y 1018-1019 (1993); Inouye *et al.*, *Animal Cell technology Basic & Applied Aspects*, 5: 609-616 (1993); Inouye *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 26: 27-39 (1993); Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24: 107-117 (1992); y Rea *et al.*, *Journal of Cell, Biochem.*, Supl. 0, Resumen No. XI-206 (17 Part A), p. 50 (1993). Las columnas de HIC comprenden normalmente una matriz de base (por ejemplo, agarosa reticulada o un material de copolímeros sintéticos) al que están acoplados los ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos alquilo o arilo). Muchas columnas de HIC están disponibles en el mercado. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, la columna Phenyl SEPHAROSE 6 FAST FLOW™ con una sustitución alta o baja (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); la columna Phenyl SEPHAROSE™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); la columna Octyl SEPHAROSE™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); las columnas FRACTOGEL™ EMD Propyl o FRACTOGEL™ EMD Phenyl (E. Merck, Alemania); los soportes MACROPREP™ Methyl o MACROPREP™ t-Butyl (Bio-Rad, California); la columna WP HI-Propyl (C 3)™ (J. T. Baker, New Jersey); y las columnas TOYOPEARL™ éter, fenilo o butilo (TosoHaas, PA).

60 Los ejemplos de matrices de cromatografía hidrófoba en lotes conocen bien la técnica e incluyen cadenas alquilo de C<sub>18</sub> unidas a una matriz de soporte tal como SEPHAROSE™, agarosa o sílice, por ejemplo butil, fenil u octil SEPHAROSE™ o polímeros tales como celulosa o poliestireno. La patente de EE.UU. N° 6.214.984 describe el uso de cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo (LPHIC) para la purificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Este método es particularmente útil para purificar fragmentos de anticuerpo, especialmente fragmentos de anticuerpo plegados correctamente y unidos con puentes disulfuro (por ejemplo, fragmentos Fab) de fragmentos de anticuerpo contaminantes que no están plegados correctamente y/o no están unidos con puentes disulfuro. Antes de la LPHIC, la composición de anticuerpo preparada a partir de las células se somete preferiblemente a al menos una etapa de purificación, cuyos ejemplos incluyen cromatografía en hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis y

cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie de isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse la proteína A para purificar anticuerpos que se basen en ciertas cadenas pesadas humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para un isotipo humano (Guss *et al.*, *EMBO J.*, 5: 1567-1575 (1886)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es generalmente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio o poli(estirenodivinil)benceno de poro controlado permiten unos caudales más rápidos y tiempos de procesamientos más cortos de los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH 3, la resina BAKERBOND ABX<sup>TM</sup> (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografías sobre sílice, cromatografías sobre heparin SEPHAROSE<sup>TM</sup>, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

15 **G. Usos de Polipéptidos**

Los polipéptidos recuperados de este modo pueden formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y se usan para diversos usos de diagnóstico, terapéuticos u otros usos conocidos para dichas moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse en inmunoensayos tales como inmunoensayos enzimáticos.

20 Los usos terapéuticos para los polipéptidos purificados usando los métodos descritos en este documento también se contemplan. Por ejemplo, puede usarse un factor u hormona del crecimiento para potenciar el crecimiento como se deseé. Y puede usarse un anticuerpo para citotoxicidad dirigida (por ejemplo para matar células tumorales), como 25 un adyuvante de vacuna, para suministrar agentes trombolíticos a coágulos, para suministrar inmunotoxinas a células tumorales, para convertir profármacos activados por enzimas en un sitio diana (por ejemplo un tumor), para tratar enfermedades infecciosas o para dirigir complejos inmunes a receptores de la superficie celular.

30 La formulación terapéutica del polipéptido se prepara para almacenamiento mezclando al polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>a</sup> edición, Osol, A., Ed., (1980)), en forma de una torta liofilizada o solución acuosa.

35 Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; 40 aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

45 Los polipéptidos también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial (por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, micro emulsiones, nano partículas y nano cápsulas) o en macro emulsiones. Dichas técnicas se describen en el documento *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*.

50 El polipéptido a usar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. El anticuerpo normalmente se almacenará en forma liofilizada o en forma de solución.

55 Las composiciones de polipéptido terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene una tapa perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

60 La vía de administración del polipéptido está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo inyección por infusión mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional o mediante sistemas de liberación sostenida como se indica a continuación. El polipéptido se administra de forma continua mediante infusión o inyección en embolada.

65 Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) como se describe por Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. N° 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico - ácido glicólico degradables

tales como el LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico - ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

5 Aunque los polímeros tales como etileno - acetato de vinilo y ácido láctico - ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 10 días, ciertos hidrogeles liberan las proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando, por ejemplo, los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la immunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de anticuerpos dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de puentes S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse purificando los restos sulfhídrido, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

10 15 Las composiciones de polipéptidos de liberación sostenida también incluyen polipéptidos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos *per se*: DE 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patente de Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545 y EP 102.324. Normalmente los liposomas son del tipo pequeño (de 20 aproximadamente 200-800 Angstrom) unilamelar en los que el contenido de lípidos es mayor de aproximadamente el 30% en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia más eficaz con el polímero.

25 Una cantidad eficaz del polipéptido a emplear terapéuticamente dependerá por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y las condiciones del paciente. Por consiguiente, será necesario que el terapéutica titule la dosificación y modifique la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico más beneficioso. Una dosificación diaria típica puede variar entre aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y aproximadamente 10  $\text{mg}/\text{kg}$  o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el médico administrará al polipéptido hasta que alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. La evolución de esta terapia se controla fácilmente mediante ensayos convencionales.

30 35 La invención se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo estos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

##### 35 *Materiales y Métodos*

###### A. *Plásmidos. Transformación. Fermentación*

###### 40 1. *Producción de rhuFab'2 (XCD1 8)*

###### a. *Construcción del Plásmido*

45 El plásmido de control, pS1130, se diseñó para la expresión dicistrónica de anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub> y se basaba en el vector descrito por Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992). Este diseño coloca la transcripción de los genes para el fragmento de cadena ligera y de cadena pesada con una cremallera de leucina C-terminal bajo el control de un único promotor *phoA*. La transmisión termina con un terminador transcripcional  $\lambda t_0$  situado cadena abajo de la secuencia codificante para la cremallera de leucina de cadena pesada (Scholtissek y Gross, *Nucleic Acids Res.*, 15(7): 3185 (1987)). La secuencia señal de enterotoxina II estable al calor (STII) precede a la secuencia codificante de cada cadena y dirige la secreción del polipéptido en el periplasma (Lee *et al.*, *Infect Immun.*, 42: 264-268 (1983); Picken *et al.*, *Infect Immun.*, 42: 269-275 (1983)). La cremallera de leucina se unió al extremo C-terminal del fragmento de cadena pesada para promover la dimerización de los dos brazos Fab'.

55 60 El plásmido promotor doble que contiene dos unidades traduccionales diferentes, pxC18-7T3 separa temporalmente la traducción de la cadena ligera de la transcripción de la cadena pesada. Como en pS1130, la cadena ligera permanece bajo el control del promotor *phoA*. Sin embargo, en pxC18-7T3, un terminador de la transcripción  $\lambda t_0$  sigue a la secuencia codificante de cadena ligera. Cadena abajo de este terminador, se añadió el promotor *tacII* para controlar la transcripción del fragmento de cadena pesada/cremallera de leucina C-terminal (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)). Un segundo terminador de la transcripción  $\lambda t_0$  sigue a esta secuencia codificante. Se usaron variantes de codón silenciosas de la secuencia señal STII para dirigir la secreción de ambas cadenas (Simmons y Mansura, *Nature Biotechnology*, 14: 629-634 (1996)).

65 En la Figura 1 se representa una comparación esquemática de un único plásmido de control del promotor frente al plásmido del promotor doble. La secuencia de cassette de expresión de pxC18-T73 se proporciona en la Figura 2 (SEC ID Nº 1) y las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº 2 y 3) de las unidades traduccionales se muestran en las Figura 3A (cadena ligera) y 3B (cadena pesada), respectivamente.

## b. Fermentación

La cepa hospedadora que se usa en la fermentación fue un derivado de *E. coli* W3110, denominada 59A7. El genotipo completo de 59A7 es W3110  $\Delta fhuA$   $\Delta phoA$  $\Delta E15$   $\Delta$  (*argF-lac*) $169$   $deoC$   $depP41$   $ilvG2096$ (*Val<sup>r</sup>*)  $\Delta prc$   $sprW148R$ .  
 5 Las células hospedadoras 59A7 se transformaron con el plásmido pXCD18-7T3 y los transformantes de éxito se seleccionaron y se multiplicaron en cultivo. Un plásmido adicional, pMS421, se co-transformó junto con pXCD18-7T3. Este plásmido adicional, pMS421, es un plásmido basado en pSC101 que proporciona *lacIq* para mejorar el control del promotor *tacII*, y que también otorga una resistencia a espectinomicina y a estreptomicina.

10 Para cada 10 litros de fermentación, se congeló un único vial que contenía 1,5 ml de cultivo en DMSO al 10-15% en un matraz de agitación de 1 l que contenía 500 ml de medio LB supplementado con 0,5 ml de solución de tetraciclina (5 mg/ml) y 2,5 ml de solución de fosfato de sodio 1 M. Este cultivo de siembra se cultivó durante aproximadamente 16 horas a 30°C y después se usó para inocular un fermentador de 10 litros.

15 El fermentador comenzaba inicialmente con aproximadamente 6,5 litros de medio que contenía aproximadamente 4,4 g de glucosa, 100 ml de sulfato magnesio 1 M, 10 ml de una solución de elemento traza (100 ml de ácido clorhídrico, 27 g de cloruro férrico hexahidrato, 8 g de sulfato de cinc heptahidrato, 7 g de cloruro de cobalto hexahidrato, 7 g de molibdato de sodio dihidrato, 8 g de sulfato cúprico pentahidrato, 2 g de ácido bórico, 5 g de sulfato de manganeso monohidrato en un volumen final de 1 litro), 20 ml de solución de tetraciclina (5 mg/ml en etanol), 10 ml de FERMAX Adyuvant 27<sup>TM</sup> (o algún anti-espumante equivalente), 1 bolsa de sales HCD (37,5 g de sulfato de amonio, 19,5 g de gramos de fosfato de potasio dibásico, 9,75 g de fosfato de sodio monobásico dihidrato, 7,5 g de citrato de sodio dihidrato, 11,3 g fosfato potásico monobásico) y 200 g de Amina A NZ (un hidrolizado de proteínas). Las fermentaciones se realizaron a 30°C con un flujo de aire 10 slpm (litros estándar por minuto) y se controlaron a un pH de 7,0 ± 0,2 (aunque en algunos casos se produjeron variaciones ocasionales más allá de este intervalo). La presión del fondo del fermentador y la velocidad de agitación se modificaban para manipular la velocidad de transferencia de oxígeno en el fermentador y como consecuencia, controlar la tasa de respiración celular.

30 Después de la inoculación de fermentador con el medio que contiene las células a partir del matraz de agitación, el cultivo se cultivó en el fermentador hasta densidades celulares altas usando un algoritmo basado en ordenador para suministrar una solución de glucosa concentrada al fermentador. También se suministraron al fermentador hidróxido de amonio (solución al 58%) y ácido sulfúrico (solución al 24%) según fuera necesario para controlar el pH. También se usaron adiciones adicionales de anti-espumante en algunos casos para controlar la formación de espuma. Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular de aproximadamente 40 DO550, se añadieron 100 ml adicionales de sulfato de magnesio 1 M al fermentador. Además, se inició una suministro de sales concentradas (compuesto por aproximadamente 10 g de sulfato de amonio, 26 g de fosfato potásico dibásico, 13 g de fosfato de sodio monobásico dihidrato, 2 g de citrato de sodio dihidrato y 15 g de fosfato potásico monobásico en 1 l de agua) al fermentador a un caudal de 2,5 ml/min cuando el cultivo alcanzaba aproximadamente 20 DO550 y continúo hasta que se añadieron aproximadamente 1250 ml a la fermentación. Las fermentaciones continuaban típicamente durante 72-80 horas.

40 Durante la fermentación, una vez que el punto de ajuste de oxígeno disuelto para el fermentador se alcanzaba, se suministraba la solución de glucosa concentrada en base a la señal de la sonda de oxígeno disuelto para controlar la concentración de oxígeno disuelto en el punto de ajuste. Por consiguiente, en este esquema de control, las manipulaciones de los parámetros de funcionamiento del fermentador tales como la velocidad de agitación o la presión de fondo, que afectan a la capacidad de transferencia de oxígeno en el fermentador, manipulaban de forma correspondiente la tasa de captación de oxígeno o la tasa metabólica de las células.

45 Se usó un espectrómetro de masas para controlar la composición del gas de salida de las fermentaciones y permitir el cálculo de la captación de oxígeno y de la evolución del dióxido de carbono en las fermentaciones.

50 Cuando el cultivo alcanzaba una densidad celular de aproximadamente 20 DO550, disminuía la agitación desde una velocidad inicial de 1000 rpm hasta aproximadamente 725 rpm durante aproximadamente 12 horas. Se añadieron cincuenta ml de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranósido (IPTG) 200 mM para inducir la síntesis de cadena pesada aproximadamente 12 horas después de que el cultivo alcanzaba una densidad celular de 220 DO550.

55 2. Producción de Factor  $F(ab') Anti-Tisular$ 

## a. Construcción del Plásmido

60 Se creó un plásmido de promotor doble, pXTF7T3, de forma similar al plásmido de promotor doble pXCD 18-7T3 mostrado anteriormente y se usó para permitir la separación temporal de la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada del factor anti-tisular. La secuencia *lacI* del plásmido pMS421 también se incorporó en el pXTF7T3 para crear un nuevo plásmido de promotor doble pJVG3IL.

## 65 b. Fermentación

66 La cepa hospedadora usada en estas fermentaciones fue un derivado de *E. coli* W3110, denominado 60H4. El genotipo completo de 60H4 es: W3110  $\Delta fhuA$  $\Delta manA$   $\Delta phoA$  $\Delta E15$   $\Delta$  (*argF-lac*) $169$   $deoC2$   $degP41$   $ilvG2096$ (*Val<sup>r</sup>*)  $\Delta prc$  *prc-supresor*. Las células hospedadoras 60H4 se transformaron con pJVG3IL y los transformantes de éxito se selec-

# ES 2 287 687 T3

cionaron y cultivaron en el cultivo. Las fermentaciones se realizaron en condiciones similares a las de anti-CD18 F (ab')<sub>2</sub> como se ha descrito anteriormente, con las excepciones principales de que la duración variaba entre 72 y 114 horas y la cadena pesada se indujo usando IPTG durante aproximadamente 4 a 12 horas después de la obtención de un cultivo DO550 de 220.

5

## 3. Producción de anticuerpos anti-TF de longitud completa

### a. Construcción del Plásmido

10 La cassette de expresión para el plásmido pxTF-7T3FL comprende, de 5' a 3': (1) Un promotor *phoA* (Kikuchi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **9** (21): 5671-5678 (1981)); (2) *trp* Shine-Dalgarno (Yanofsky *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **9**: 6647-6668 (1981)); (3) una variante del codón silencioso de la secuencia señal STII (TIR fuerza relativa de aproximadamente 7) (Simmons y Yansura, *Nature Biotechnology*, **14**: 629-634 (1996)); (4) la secuencia codificante para la cadena ligera del factor anti-tisular; (5) un terminador  $\lambda t_0$  (Scholtissek y Grosse, *Nucleic Acids Res.*, **15**: 3185 (1987));  
15 (6) un promotor *tacII* (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 21-25 (1983)); (7) un segundo *trp* Shine-Dalgarno; (8) una segunda variante del codón silencioso de la secuencia señal STII (TIR fuerza relativa de aproximadamente 3); (9) secuencia codificante para la cadena pesada de longitud completa del factor anti-tisular; y (10) un segundo terminador  $\lambda t_0$ . Esta cassette de expresión se clono en el marco del plásmido pBR322 de *E. coli* (Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**: 77-90 (1978)).

20

Por lo tanto, el diseño del vector pxTF-7T3FL permite la separación temporal de la expresión de cada cadena usando dos promotores diferentes en lugar de dos iguales. En este plásmido, la cadena ligera está bajo el control del promotor *phoA*. Sin embargo, se usa el promotor *tacII* para controlar la transcripción de la cadena pesada. Como se sabe en la técnica, los promotores *phoA* y *tacII* se inducen en condiciones substancialmente diferentes. Una comparación esquemática de un plásmido de promotor único paTF 130 y pxTF-7T3FL se representa en la Figura 4. La secuencia de ácido nucleico de la cassette de expresión de pxTF-7T3FL (SEC ID Nº 4) se proporciona en la Figura 5 y la secuencias de polipéptidos que codifica (SEC ID Nº 5 y 6) se proporcionan en la Figura 6A (cadena ligera) y 6B (cadena pesada), respectivamente. Las células hospedadoras a continuación se co-transformaron con pxTF-7T3FL y pJJ247. pJJ247 codifica un promotor *tacII* que controla la expresión de DsbA y DsbC, con DsbA primero en la serie, y sus construcciones se describen en el documento WO02/061090.

30

### b. Fermentación

Para la expresión a pequeña escala se usó la cepa de *E. coli* 61D6, con el genotipo W3110  $\Delta fhuA$  ( $\Delta tonA$ ) *ptr3* 35 *lacIq lacL8 ΔompTΔ (nmpc-fepE) degP41*, como célula hospedadora. Después la transformación, las tomas del transformante seleccionado se inocularon en 5 ml de medio de Luria-Bertani suplementado con carbenicilina (50  $\mu$ g/ml) y kanamicina (50  $\mu$ g/ml) cultivado a 30°C en una rueda de cultivo durante una noche. Se realizó una fermentación de 10 litros usando los medios descritos en el documento WO02/061090 y las condiciones de fermentación básicas también eran como se describen en el documento WO02/061090, excepto que se realizaron las siguientes modificaciones al 40 proceso de fermentación: 300 ml de NaPO<sub>4</sub> 1 M, pH 7,0 se añadieron a aproximadamente 40 horas para dar una concentración de aproximadamente 30 mM. Se añadieron 100 ml de una solución 200 mM de IPTG a aproximadamente 44 horas para dar una concentración de aproximadamente 2 mM. La fermentación se recogió 80 horas después de la inoculación.

45

### B. Identificación de las Proteínas

Se realizó la electroforesis en gel SDS-PAGE unidimensional en un gradiente de acrilamida lineal del 4-12% de Novex. Específicamente, el sistema usado fue el sistema NOVEX® NUPAGE™, compuesto por geles NUPAGE™ Bis-TRIS Pre-Cast (para proteínas de peso molecular bajo a medio).

50

### C. Productos Químicos

El agente de precipitación lactato de etacridina era puro al 98% y se adquirió de Sigma (St. Louis, MO, USA). El lactato de etacridina tiene un peso molecular de 361,4 Da. Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica.

55

### D. Precipitación

Los materiales de *E. coli* que contenían anticuerpo y F(ab')<sub>2</sub> se homogeneizaron usando un microfluidizador de 60 Watts Fluidar Inc. (modelo B12-04DJC, Kittery, MN, USA). Las células se pasaron tres veces a través del microfluidizador a una presión de 4 bares. Para evitar la degradación por calor de las proteínas, el material se pasó a través de un baño de agua con hielo durante cada paso a través del microfluidizador. La concentración total de proteínas en los homogenados de F(ab')<sub>2</sub> era de 30 mg/ml. El homogenado anti-TF de longitud completa, que se obtuvo a partir de una pasta resuspendida, tenía una concentración total de proteínas de 18 mg/ml. La pasta anti-TF se resuspendió en 65 tampón TRIS-HCl 25 mM, pH 7,5.

El agente de precipitación lactato de etacridina se disolvió en agua hasta la concentración final deseada (p/v).

### 1. Estudio del pH

Los experimentos de precipitación se realizaron con una concentración de lactato de etacridina constante del 0,6% (p/v). Se preparó una solución de lactato de etacridina al 0,8% y se mezcló con el homogenado de *E. coli* en una proporción de 3:1, por ejemplo, 3 ml de lactato de etacridina y 1 ml de homogenado de *E. coli*. El pH se ajustó usando HCl o NaOH dependiendo del pH deseado.

### 2. Estudio de la Concentración de Lactato de Etacridina

El homogenado se diluyó 4 veces con soluciones madre de lactato de etacridina (1:3 como en el estudio del pH) y el pH se mantuvo a un valor de ajuste para cada una de las proteínas diana. Para anti-CD 18, el pH era de 8,5 y para anti-TF pH 7,5. Las concentraciones finales de lactato de etacridina en el sistema de precipitación eran del 0,15, 0,30, 0,45, 0,60, 0,75 y 0,9% (p/v). Como referencia se realizó una serie de experimentos con lactato de etacridina al 0%.

### 3. Estudio de Conductividad/Dilución

Se añadieron diversas concentraciones de NaCl al homogenado anti-CD18 para evaluar el efecto de la conductividad sobre la precipitación de proteínas. Las concentraciones de NaCl estudiadas eran 0, 50, 100, 150, 200 y 400 mM. También se realizó una serie de referencia sin lactato de etacridina para determinar si precipitaba cualquier proteína debido a la alta concentración de sales. El pH en este estudio de pico de sales era de 8,5 y el homogenado de anti-CD18 se diluyó 4 veces. La concentración de lactato de etacridina en las muestras era del 0,6% y del 0% para los experimentos de referencia.

Para cambiar la conductividad de la muestra los homogenados se diluyeron en cantidades en aumento, el pH se mantuvo constante, pH 8,5 y 7,5 para el anti-CD18 y anti-TF, respectivamente. Todos los experimentos tenían una concentración de lactato de etacridina final del 0,6% (p/v). Los homogenados se diluyeron 2, 3, 4, 5, 6 y 7 veces.

### 4. Estudio de la Temperatura

Algunos experimentos se realizaron a temperaturas elevadas. El homogenado de *E. coli* se diluyó 4 veces y la concentración final de lactato de etacridina era del 0,6%. El pH era 8,5 ó 7,5 para anti-CD18 y anti-TF respectivamente. Las muestras se incubaron en un baño de agua con un termostato con una temperatura deseada, es decir, 50, 60 y 70°C. Las muestras se incubaron durante 20-120 minutos a temperaturas elevadas. Se realizó una incubación de periodo largo, 16 horas a 50°C.

Después de mezclar el agente de precipitación y el homogenado de *E. coli* conjuntamente y de ajustar el pH, las muestras se incubaron en condiciones de agitación durante 30-60 minutos. Los experimentos de precipitación se realizaron en tubos de vidrio, a una escala de 4 ml. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se presentaron los valores medios.

### E. Ensayo de Proteínas de *E. coli*

El lactato de etacridina interacciona con los ensayos de medición de proteína usados más comúnmente, por ejemplo Bradford, BCA, y la absorción espectrofotométrica medida a 280 nm. De este modo, las concentraciones de proteína totales fueron medidas usando un ELISA de proteínas de *E. coli* genético. Las muestras de diluyeron en un tampón que contenía gelatina de pescado (NaCl 0,15 M, NaPO<sub>4</sub> 0,1 M, gelatina de pescado al 0,1%, TWEEN 20<sup>TM</sup> al 0,05%, PROCLIN<sup>TM</sup> 300 al 0,05%) para reducir la unión no específica de los anticuerpos antiproteínas de *E. coli*. El anticuerpo de cobertura era anticuerpo de cabra anti-ECP. El anticuerpo conjugado fue un anticuerpo anti-anticuerpo ECP completo, unido a peroxidasa de rábano rusticano. La absorción a 405 nm se controló usando un lector de placas de Molecular Devices modelo SPECTRA MAX PLUS<sup>TM</sup> (Sunnyvale, CA, USA).

### F. Ensayo de Proteína G

Para medir las concentraciones de F(ab')<sub>2</sub> y anticuerpos recuperadas, se realizó un ensayo de cromatografía de afinidad de proteína G. Se adquirió una columna de proteína G INMUNO DETECTION<sup>TM</sup> de PerSeptive Biosystems (Framigham, MA, USA). La columna se equilibró con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se diluyó con PBS que se había ajustado a un pH de 2,2 con HCl. Para minimizar la interferencia del lactato de etacridina, las muestras se trataron con columnas de centrifugado de exclusión (columnas BIO-SPIN<sup>®</sup> 6 Tris (Bio-Rad Laboratorios, Hércules, CA, USA)) antes del ensayo. Las columnas de centrifugado se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se introdujo una etapa de lavado con cloruro de tetrametilamonio (TMAC) (Fahrner *et al.*, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18: 302-327 (2001)) al método cromatográfico para minimizar cualquier interferencia del lactato de etacridina residual en la muestra. El ensayo se realizó usando un HPLC (cromatógrafo líquido HP 1090<sup>TM</sup>) de Hewlett Packard (Mountain View, CA, USA). Las muestras se diluyeron con PBS. Las curvas patrón se prepararon para cada una de las proteínas usando proteína purificada (de Genentech, Inc).

G. *Ensayo del ADN*

La concentración de ADN en los sobrenadantes después de la precipitación se midió usando un kit Pico Green Kit de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Este es un ensayo de fluorescencia donde el reactivo fluorescente (Pico Green) se une a un ADN de doble cadena. El reactivo Pico Green se excita a 502 nm y se registra la emisión a 523 nm. El ensayo se realizó usando un lector de placas de fluorescencia SPECTRA MAX GENINI XS™, de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). El lactato de etacridina interacciona con el ensayo de Pico Green y de este modo se retiró el agente de precipitación de la solución antes del análisis. El lactato de etacridina se retiró de la muestra usando columnas BIO-SPEN® 6 TRIS, descritas en la sección de ensayo de cromatografía de afinidad de proteína G.

10

H. *SDS-PAGE*

Los sobrenadantes obtenidos después de la precipitación de lactato de etacridina se analizaron mediante SDS-PAGE. Se usaron geles NUPAGE™ al 4-12% no reducidos de Novex (San Diego, CA, USA) para visualizar la purificación y recuperación de anti-CD18 y anti-TF. Se usaron geles sin moldear y el tampón de ensayo era MOPS (concentrado previamente y adquirido de Novex). Los geles se tiñeron con una solución filtrada de COOMASSIE BRILLIAN BLUE R250™. Los sobrenadantes se compensaron en volumen con respecto al extracto de *E. coli* aclarado. De esta manera, la intensidad de las bandas de proteína en el extracto de *E. coli* y en las muestras debe ser idéntica si se obtiene un rendimiento del 100% en los sobrenadantes después de la precipitación con lactato de etacridina. De este modo, los geles pueden usarse para indicar exactamente el grado de purificación obtenido a partir de la precipitación.

I. *Solubilidad del Lactato de Etacridina*

25

Se estudiaron dos soluciones de lactato de etacridina, es decir al 0,6 y al 1,2%. Cada solución se dividió en dos alícuotas y el pH se ajustó al 6,0 y al 9,0 respectivamente. Para obtener una ligera capacidad tamponante en el sistema, el lactato de etacridina se disolvió en tampón Tris-HCl 10 mM. Cada solución de lactato de etacridina se expuso a cantidades en aumento de NaCl, es decir 0, 50, 100, 150, 200, 300 y 600 mM. Las muestras se incubaron durante 3 horas, después se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000 g en una microcentrifuga (SORVALL MC12V™, Dupont, Wilmington, DE, USA). Los sobrenadantes se ensayaron para detectar el lactato de etacridina midiendo la absorción a 270 nm. El espectrofotómetro usado era un HP8453 UV-VIS™ de Hewlett Packard (Wilmington, DE), actualmente Aligent Technologies (Palo Alto, CA) y conocido como el espectrofotómetro ALIGENT 8453 UV-VIS™. Se obtuvo una curva patrón a partir de una solución con concentración de lactato de etacridina conocida.

35

J. *Turbidez*

Para medir la estabilidad de los sobrenadantes en función del tiempo y de la temperatura, se controló la turbidez. El turbidímetro usado era de HACH (modelo 2100N, Ames, Iowa, USA). Las muestras se midieron a temperatura ambiente y sin dilución de la muestra.

40

El homogenado anti-CD18 se trató con lactato de etacridina al 0,6%, PEI al 0,2% o solamente con agua. En las tres muestras el homogenado anti-CD18 se diluyó 4 veces y el pH era de  $7,2 \pm 0,2$ . Despues del centrifugado durante una hora a 4000 g los sobrenadantes se recuperaron y se dividieron en dos alícuotas. Una parte de cada muestra se incubó a temperatura ambiente (21°C) y la otra a 4°C.

45

## Resultados y Análisis

## Efecto del pH

50

La molécula del lactato de etacridina está cargada positivamente en la mayor parte del intervalo de pH (Millar, *supra*; Neurath y Brunner, *supra*; Franek, Methods in Enzymology, ed. Langone, J.J., Van Vunakis, H., 121: 631-638 (1986)). Sin embargo, puesto que los cambios del pH afectan a la carga de los polipéptidos y existe una correlación entre el pI del polipéptido y el pH al que precipita cuando se expone al lactato de etacridina (Neurath y Brunner, *supra*), se investigó el efecto del pH en el grado de purificación en el método de esta invención.

55

Los homogenados que contenían anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, anti-TF F(ab')<sub>2</sub> y anti-TF de longitud completa, respectivamente, se expusieron a una solución de lactato de etacridina al 0,6% ajustada para cubrir el intervalo de pH 4-10. Las figuras 8A-8C muestran las fases aclaradas después del tratamiento con lactato de etacridina y del centrifugado de cada una de estas proteínas, respectivamente.

60

En la Tabla 1, se estudió anti-TF como un anticuerpo de longitud completa y como un F(ab')<sub>2</sub>. Los homogenados de *E. coli* se trataron a una proporción de 1:3 con una solución de lactato de etacridina al 0,8% (p/v), es decir una concentración final de lactato de etacridina del 0,6% en la muestra. El pH se ajustó con HCl y NaOH respectivamente para obtener un pH deseado. La producción y los factores de purificación se calculan con respecto a cada uno de los homogenados celulares aclarados. La concentración de ADN en los sobrenadantes recuperados también se presenta en la tabla.

TABLA 1

El efecto del pH sobre la purificación y producción de  $\alpha$ CD18 y  $\alpha$ TF cuando se tratan con lactato de etacridina

pH	anti-CD18 F(ab') <sub>2</sub>		anti-TF F(ab') <sub>2</sub>		Anticuerpo anti-TF de longitud completa		Concentración de ADN ( $\mu$ g/ml)
	Factor de purificación*	Producción (%)	Factor de purificación	Producción (%)	Factor de purificación	Producción (%)	
4	3,2	100	1,8	93	2,4	100	0,2
5	5,3	100	5,1	93	4,4	100	0,1
6	5,6	100	5,1	67	6,7	100	$\leq 0,001$
7	5,6	100	5,4	70	7,1	86	$\leq 0,001$
8	5,6	87	5,0	42	6,2	65	$\leq 0,001$
9	5,4	84	4,7	22	5,3	24	$\leq 0,001$
10	4,2	85	4,7	18	0,9	7	0,3

\* Un valor de 1 es la misma purificación que se obtiene en el sistema no tratado con lactato de etacridina.

Puede observarse que para las tres proteínas se obtuvo una curva con forma de campana con respecto al grado de purificación y concentración de ADN en el intervalo de pH de 4 a 10. En los valores de pH medios, es decir pH 5-9, se obtuvo una purificación de aproximadamente 5 veces. La producción de anticuerpo anti-CD10 F(ab')<sub>2</sub> y anti-TF de longitud completa y F(ab')<sub>2</sub> disminuyó con un pH mayor, y el anticuerpo anti-TF de longitud completa y F(ab')<sub>2</sub> tenían mayor dependencia del pH que el anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>. La producción de anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub> disminuye del 100 al 85% y la de anti-TF F(ab')<sub>2</sub> del 93 al 18% en el intervalo de pH de 4-10. Sin limitarse a ninguna teoría, esto podría deberse al pI más bajo del anti-TF en comparación con el anti-CD18, por ejemplo pI 7,5 y 8,9 respectivamente. Sin embargo, estos son valores de pI calculados de forma teórica.

La proteína anti-TF de longitud completa tenía una dependencia del pH aun mayor que la versión F(ab')<sub>2</sub> de la proteína. La pureza de la anti-TF de longitud completa es mayor a pH 7,0. A pH por encima de 8 se observan pérdidas de producción significativas (Figura 8C). Para el anti-TF de longitud completa se requiere un pH se aproximadamente 7,0, es decir una purificación de 7,1 veces y una producción del 86%. Una explicación posible para las mayores pérdidas de anti-TF en comparación con anti-CD18, sin limitarse a ninguna teoría, es que anti-Tf tiene mas cargas superficiales negativas que el anti-CD18 cuando se incubó por encima de su pI. Análogamente a esto, sin limitarse a ninguna teoría, el anti-TF de longitud completa de mayor tamaño puede tener mas cargas superficiales negativas que el F(ab')<sub>2</sub> correspondiente y por lo tanto se observa una perdida de producción significativamente mayor cuando se aumenta el pH.

Sin embargo, los componentes diferentes a los restos celulares y a la proteína hospedadora tienen que retirarse del polipéptido diana. Uno de tales componentes es el ADN. La principal desventaja de tener una concentración de ADN alta junto con el polipéptido diana es que aumenta la viscosidad de la solución. Esto tendrá un impacto negativo en el proceso adicional cadena abajo. Además, si se usa una columna de intercambio aniónico como la primera columna de captura, el ADN cargado negativamente se unirá a la resina y de este modo reducirá la capacidad para proteínas de la columna.

De este modo, se determinó la concentración de ADN en el sobrenadante después de la precipitación con lactato de etacridina. Los resultados muestran que la concentración de ADN en los sobrenadantes después de la precipitación de lactato de etacridina se reduce significativamente en comparación con la concentración de ADN inicial obtenida en el homogenado de *E. coli*. Sin embargo, la concentración de ADN en el sobrenadante aumentaba a medida que el pH del mismo aumentaba, es decir, 0,1 y 0,2  $\mu$ g/ml a pH 5,0 y 4,0 respectivamente. Sin limitarse a ninguna teoría, esto podría deberse al hecho de que los fosfatos del ADN se vuelven menos cargados negativamente a un pH inferior. A un pH muy alto, por ejemplo pH 10,0, la concentración de ADN aumenta significativamente (0,3  $\mu$ g/ml) y la pureza de las proteínas también disminuyó. Sin limitarse a ninguna teoría, esto se debe en parte al hecho de que el pH está por encima del pI del anticuerpo y de F(ab')<sub>2</sub>; sin embargo, esto también puede deberse en parte a que el lactato de etacridina está menos cargado a este pH.

*Efecto de la concentración de lactato de etacridina*

Los homogenados de *E. coli* se mezclaron con soluciones de lactato de etacridina en una proporción de (1:3). La concentración de lactato de etacridina en las muestras aumentaba en incrementos del 0,15% desde el 0 al 0,9% (p/v). Este estudio se realizó a pH 8,7, 7,5 y 6,0 para anti-CD18, anti-TF F(ab')<sub>2</sub> y anticuerpo de longitud completa, respectivamente.

La Tabla 2 muestra el efecto de la concentración de lactato de etacridina sobre la purificación y la producción. En la Tabla 2, el anti-TF se estudió como un anticuerpo de longitud completa y como un F(ab')<sub>2</sub>. Los homogenados de *E. coli* se trataron en una proporción de 1:3 con diferentes concentraciones de soluciones de lactato de etacridina. Se presenta la concentración final de lactato de etacridina en las muestras. El pH del anti-CD18, anti-TF (F(ab')<sub>2</sub>) y anti-TF de longitud completa era de 8,5, 7,5 y 6,0 respectivamente. La concentración de ADN en los sobrenadantes recuperados también se presenta en la tabla.

15

TABLA 2

*El efecto sobre la pureza y la producción de anti-CD18 y anti-TF cuando se tratan con concentración de lactato de etacridina en aumento*

20	anti-CD18 F(ab') <sub>2</sub>		anti-TF F(ab') <sub>2</sub>		Anticuerpo longitud completa		Concentración de ADN ( $\mu$ g/ml)	
	Lactato de etacridina (% p/v)	Factor de purificación* (%)	Producción	Factor de purificación	Producción (%)	Factor de purificación (%)		
30	0	1,0	100	1,0	100	1,0	100	77,9
	0,15	1,1	100	1,3	97	3,4	100	3,9
	0,30	1,7	100	2,2	93	6,7	100	0,4
35	0,45	4,0	100	5,2	96	6,5	100	0,2
	0,60	5,8	100	5,6	98	6,5	100	$\leq 0,001$
	0,75	5,9	100	5,6	78	6,3	100	$\leq 0,001$
40	0,90	5,9	100	5,4	70	6,3	100	$\leq 0,001$

\* Un valor de 1 es la misma purificación que se obtiene en el sistema no tratado con lactato de etacridina.

45 La pureza de los anticuerpos demostraba estar fuertemente correlacionada con la concentración de lactato de etacridina (Figuras 9A-9C y Tabla 2). A concentraciones de lactato de etacridina por encima de aproximadamente el 0,6% el efecto de la concentración de lactato de etacridina aumentada sobre la purificación aumentada no era muy drástico. Sin embargo, a concentraciones inferiores de lactato de etacridina, es decir, cuando el lactato de etacridina es deficiente, cada adición ligera del agente de precipitación dio como resultado una purificación adicional sustancial del F(ab')<sub>2</sub>.

50 La producción de anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub> no se veía afectada por la adición de diferentes concentraciones de lactato de etacridina. La recuperación por etapas para los dos F(ab')<sub>2</sub> era de aproximadamente el 90% para todos los experimentos. Sin embargo, parece más fácil obtener una recuperación cuantitativa del F(ab')<sub>2</sub> anti-CD18 que del anti-TF F(ab')<sub>2</sub>. Sin limitarse a ninguna teoría, esto podría ser porque hay mas cargas superficiales negativas en el anti-TF F(ab')<sub>2</sub> en comparación con el anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub> al pH estudiado. El anti-TF de longitud completa alcanzaba su purificación máxima a una concentración de lactato de etacridina inferior que la proteína F(ab')<sub>2</sub> correspondiente, 0,3 y 0,6% respectivamente. Sin limitarse a ninguna teoría, esto se debe probablemente a la menor concentración global de proteínas en el homogenado de longitud completa anti-TF es decir, 18 y 30 mg/ml para el anti-TF de longitud completa y F(ab')<sub>2</sub> respectivamente. El anti-TF de longitud completa también se obtiene de la pasta resuspendida y el F(ab')<sub>2</sub> se toma en forma de caldo directamente del fermentador. De hecho, los componentes del medio de cultivo solubles presentes en el caldo de *E. coli* no estarán presentes en el material anti-TF de longitud completa resuspendido, lo que podría explicar en parte las diferencias observadas, sin limitarse a ninguna teoría.

65 La concentración de ADN en los sobrenadantes está muy correlacionada con los datos obtenidos para la purificación de proteínas. A una adición de lactato de etacridina del 0,6% o superior, no se detectó ADN en los sobrenadantes. También existe una clara tendencia de disminuir la concentración de ADN, es decir de 78 a 0  $\mu$ g/ml, en los sobrenadantes cuando la concentración de lactato de etacridina aumenta del 0 al 0,6%.

*Efecto de la Conductividad*

A medida que el lactato de etacridina precipita las proteínas en parte debido a las características de carga de la molécula (Neurath y Brunner, *supra*), la conductividad de la muestra puede tener un efecto sobre la pureza del anticuerpo y del  $F(ab')_2$  después de la precipitación. De hecho, si la muestra tiene una alta concentración de sales, es decir alta conductividad, las sales podrían proteger a las proteínas del lactato de etacridina y de este modo reducir el efecto de purificación.

El homogenado anti-CD18 se sometió a dos series de experimentos para separar el efecto de la conductividad de la concentración de proteínas en la muestra. A las dos series de experimentos se le añadieron NaCl (0-400mM). Una serie de experimentos contenía lactato de etacridina al 0,6% y en la otra serie se usó agua. Los sistemas que contenían agua se usaron como controles, de modo que si el NaCl daba origen a cualquier precipitación esta podría distinguirse de la precipitación obtenida a partir del lactato de etacridina. En los sistemas sin lactato de etacridina, es decir los sistemas con agua, no se observó precipitación de proteínas en el intervalo de concentración de NaCl de 0-400 mM (Figura 10A). Los experimentos que contenían lactato de etacridina mostraban un fuerte aumento en la purificación de anti-CD18 cuando la conductividad disminuía (Figura 10B).

Sin limitarse a ninguna teoría, una razón para la purificación mejorada de anti-CD18 a una conductividad menor podría ser la baja capacidad de protección del lactato de etacridina cargado a una concentración de sales baja. Se han observado efectos de protección análogos cuando se usa PEI para la purificación de proteínas a concentraciones de sales en aumento (Jendrisak, *supra*). Sin embargo, un factor aún más importante es la baja solubilidad del lactato de etacridina a concentración de sales mayores (Millar, *supra*; Neurath y Brunner, *supra*; Franek, *supra*). A NaCl 100 mM la precipitación del lactato del etacridina se observó en el sistema de extracción, y a medida que aumentaba la concentración de sales, precipitaba más lactato de etacridina. De este modo, menos lactato de etacridina es soluble en el sistema y está disponible para precipitar proteínas y otras biomoléculas.

Cuando se estudiaba la solubilidad del lactato de etacridina en función de la concentración de NaCl, se observó una dependencia del pH (Figura 11). A pH 6 no se observaba diferencia significativa en la solubilidad entre la solución de lactato de etacridina al 0,6 y al 1,2%. Las dos soluciones eran solubles a NaCl 50 mM pero casi precipitaban completamente a 100 mM. Para las soluciones a pH 9, donde el lactato de etacridina estaba menos cargado, se observó una diferencia de la solubilidad significativa entre las dos concentraciones de lactato de etacridina. La solución de lactato de etacridina al 0,6% precipitaba a una concentración de sales inferior que la solución de lactato de etacridina más concentrada (Figura 11). Los cloruros han demostrado precipitar lactato de etacridina de forma especialmente eficaz (Franek, *supra*).

En la práctica, la conductividad de un experimento de precipitación se determinará mediante el factor de dilución. De hecho, se realizaron una serie de experimentos donde el impacto del factor de dilución del homogenado de *E. coli* se estudiaba. La concentración global de lactato de etacridina de mantuvo constante, es decir, al 0,6% (p/v), pero la conductividad de la muestra se disminuía con una dilución aumentada. Los resultados se muestran en la Tabla 3. En la Tabla 3, se estudió anti-TF como un anticuerpo de longitud completa y como un  $F(ab')_2$ . La concentración de lactato de etacridina era del 0,6% (p/v). El pH del anti-CD18 anti-TF( $F(ab')_2$ ) y anti-TF de longitud completa era de 8,5, 7,5 y 6,0 respectivamente. La producción y los factores de purificación se calculan con respecto a cada uno de los homogenados celulares aclarados. La concentración de ADN en los sobrenadantes recuperados también se presenta en la Tabla.

45

TABLA 3

*El efecto sobre la pureza y la producción de anti-CD18 y anti-TF de la dilución de los homogenados de *E. coli* en diferentes cantidades*

50

55			anti-CD18 $F(ab')_2$		anti-TF $F(ab')_2$		Anticuerpo anti-TF de longitud completa Ab		Conc. de ADN (µg/ml)
	Dilución (veces)	Cond. (mS)	Factor de purificación*	Producción (%)	Factor de purificación*	Producción (%)	Factor de purificación*	Producción (%)	
60	2	5,0	2,4	72	2,3	77	3,4	70	20,7
	3	4,0	4,1	76	4,0	60	6,7	82	0,5
	4	3,2	5,5	71	4,9	95	6,7	95	≤ 0,001
	5	2,7	6,1	88	5,2	100	6,5	100	≤ 0,001
65	6	2,4	6,1	92	5,0	100	6,0	100	≤ 0,001
	7	2,1	6,3	100	5,1	100	6,0	100	≤ 0,001

\* Un valor de 1 es la misma purificación que se obtiene en el sistema no tratado con lactato de etacridina

Los resultados mostraban que la purificación de  $F(ab')_2$  se potenciaba si la conductividad se rebajaba aumentando la dilución. Sin embargo, a una conductividad de 3,5 mS o inferior el efecto de la conductividad era secundario. Para el homogenado del *E. coli* usado en este ejemplo debía realizarse una dilución de 4 veces para obtener conductividad por debajo de 3,5 mS. Para el anticuerpo anti-TF de longitud completa puede realizarse una dilución ligeramente menor que para los homogenados de  $F(ab')_2$ . Sin limitarse ninguna teoría, esto puede deberse al hecho de que la concentración de proteínas en el homogenado de longitud completa es menor. Además, como el material de longitud completa se obtiene a partir de una pasta resuspendida, Algunos de los componentes de los medios que pueden afectar a la precipitación se han retirado antes de la precipitación del lactato de etacridina. En estos experimentos la concentración de proteínas disminuyó con una dilución aumentada (rebajando la conductividad). De este modo, incluso si se añadía lactato de etacridina al 0,6%, que se descubrió que era una concentración excesiva en el estudio de concentración de lactato de etacridina, no se obtenía la retirada máxima de la proteína y del ADN del hospedador en la muestra menos diluida. Esto se debe a la concentración de homogeneado aumentada, es decir, de proteína y de ADN globales, en estas muestras en comparación con la muestra realizada en el estudio de concentración de lactato de etacridina. De hecho, la concentración global de proteína, ADN y otros componentes afectará a la concentración de lactato de etacridina o como alternativa a la dilución requerida. La producción de anti-CD18  $F(ab')_2$  y anti TF de longitud completa y  $F(ab')_2$  aumentaba con la disminución de la conductividad.

También se descubrió que el efecto de la retirada del ADN dependía de la conductividad. A una dilución de dos veces, es decir, 5,0 mS, se obtuvo una alta concentración de ADN en el sobrenadante, 20,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sin embargo, si se realizaba una dilución de tres veces, es decir, 4,0 mS, la concentración disminuía hasta 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e incluso a una dilución mayor no se detectaba ADN. Como se ha señalado anteriormente, en este caso la cantidad total de lactato de etacridina con respecto a proteína y ADN aumenta con las diluciones mayores, es decir, a menor conductividad. Por lo tanto, el efecto observado en este ejemplo es el de rebajar la conductividad y el de aumentar las cantidades de lactato de etacridina.

#### 25 *Efecto de la temperatura*

La temperatura es un efecto que se sabe que es importante cuando se realizan experimentos de precipitación. Por lo tanto, se estudiaron algunas temperaturas elevadas junto con lactato de etacridina. El efecto del tiempo de incubación a temperatura elevada también se investigó.

La incubación a temperatura elevada, es decir 50-70°C tenía un efecto positivo sobre la pureza de las dos proteínas  $F(ab')_2$  (Figuras 12A y 12B). Cuanta más alta era la temperatura, más eficaz era la purificación. Una incubación a 70°C mejoró de forma significativa la pureza de las proteínas  $F(ab')_2$ . La incubación de la muestra durante un periodo de tiempo más largo, 40 minutos, en comparación a los 20 minutos a 70°C no mejoró la pureza del  $F(ab')_2$  (Figuras 12A y 12B), pero se observó una pérdida de la producción de aproximadamente el 10%. Sin embargo, cuando la muestra se incubó por encima de 70°C, no se recuperó  $F(ab')_2$ , lo que se debe a precipitación por temperatura de  $F(ab')_2$  así como de otras proteínas de *E. coli*.

40 Para investigar el efecto del tiempo de incubación de forma más exhaustiva, se realizó un experimento donde las muestras se incubaron durante 16 horas y 30 minutos a 50°C. Los resultados demostraron que no había mejora significativa en la purificación para la muestra que se había incubado durante 16 horas en comparación con los 30 minutos a esta temperatura. Esto indica que la precipitación por temperatura es un fenómeno rápido, lo que sugiere que un calentamiento rápido a la temperatura apropiada será más adecuado que un tiempo de incubación largo.

45 El anti-TF de longitud completa también se estudió a temperaturas elevadas. Una incubación de 15 minutos a 50°C tenía un efecto ligeramente positivo sobre la pureza del anticuerpo y no se observaron pérdidas en el material recuperado en comparación con una muestra incubada a temperatura ambiente (Figura 12C). Sin embargo, si la temperatura aumentaba a 60°C, prácticamente todo el anti-TF precipitaba. Los datos indican que el anti-TF de longitud completa tiene una estabilidad menor a temperatura elevada que la proteína anti-TF  $F(ab')_2$ . Puesto que un aumento a temperatura podría dar origen a modificaciones en el polipéptido diana, la estabilidad del polipéptido particular de interés a temperaturas elevadas debía evaluarse necesariamente antes de la implementación.

#### 55 *Estabilidad del chorro de suministro*

Es importante recuperar los chorros de suministro lo más limpios posibles. Sin embargo, otra característica importante del chorro de suministro es la estabilidad en el tiempo. De hecho, se comparó la estabilidad de los sobrenadantes después del tratamiento con el lactato de etacridina con PEI y un sobrenadante después de un centrifugado plano. Cada uno de los sobrenadantes se incubó a dos temperaturas, es decir temperatura ambiente (21°C) y 4°C. La estabilidad se controló midiendo la turbidez de la muestra respectiva.

En la Figura 13 se muestra el cambio en la turbidez en el tiempo para tres sobrenadantes diferentes, es decir, lactato de etacridina, PEI y sobrenadante aclarado no tratado respectivamente. Puede observarse claramente que los poliélectrolitos, es decir, lactato de etacridina y PEI, redujeron significativamente la turbidez del sobrenadante. Directamente después del aclarado, el sobrenadante aclarado no tratado tenía una turbidez de aproximadamente 700 NTU, mientras que la muestra tratada con PEI tenía solamente la mitad de esa turbidez, es decir 327 NTU y el sobrenadante de lactato de etacridina tenía una turbidez de 1 NTU. No se observaba una diferencia mayor, en el tiempo o con temperaturas de incubación, cuando se controlaba la turbidez del sobrenadante tratado con PEI. Para el sobrenadante que solamente

se había centrifugado, había una tendencia de una menor turbidez en la muestra de la temperatura ambiente durante las primeras 48 horas. Sin embargo, la muestra a temperatura ambiente a las 72 horas no podía medirse debido a la gran turbidez de la muestra. El sobrenadante tratado con lactato de etacridina tenía una turbidez muy baja que no aumentaba significativamente si se incubaba a 4°C. Cuando la muestra se incubaba a 21°C la turbidez aumentaba de forma significativa, es decir de 1 a 100 NTU durante 72 horas. Sin embargo, 100 NTU sigue siendo menos que la turbidez obtenida para los otros dos sobrenadantes directamente después del aclarado. De hecho, puede concluirse que el sobrenadante recuperado después del tratamiento con lactato de etacridina a pH 7 es un chorro de suministro estable.

10 *Conclusión*

El lactato de etacridina puede usarse con éxito como un agente de precipitación para la recuperación primaria de polipéptidos heterólogos a partir de un caldo homogeneizado de cultivo. Cuando se usa lactato de etacridina como agente de precipitación, el polipéptido diana ideal tiene preferiblemente un PEI mayor que la media de las proteínas operadoras. De hecho, la mayoría de las proteínas pueden estar cargadas negativamente y precipitan mediante el lactato de etacridina al mismo tiempo que la proteína diana está cargada positivamente y por lo tanto se recupera en el sobrenadante.

La concentración preferida de lactato de etacridina para la precipitación depende en gran medida de la concentración de la proteína hospedadora y del ADN en el caldo homogeneado. Cuanto mayor sea la concentración de proteína y ADN en el caldo homogenizado, mayor es la cantidad de lactato de etacridina requerido. De hecho, cuantos más componentes negativamente cargados estén disponibles para complejarse con el lactato de etacridina, y por lo tanto para precipitar, mayor es la cantidad requerida de lactato de etacridina para la precipitación. Cuanto menor sea la conductividad de la solución cuando se realiza la precipitación, más eficaz es la purificación del polipéptido. La etapa de precipitación proporcionará una purificación del polipéptido y una reducción de ADN significativas al mismo tiempo que se retiran los restos celulares.

Para precipitación de la proteína y del ADN del hospedador eficaz, el pH está generalmente entre aproximadamente 4 y 10, y preferiblemente no más de aproximadamente pH 9, ya que la molécula se vuelve menos cargada por encima de este pH. El lactato de etacridina debe usarse más preferiblemente en el intervalo de pH de aproximadamente 5-9 cuando se purifica polipéptido. Para mejorar la purificación, puede realizarse una incubación corta a temperatura elevada, sin embargo, debe determinarse la estabilidad a temperaturas elevadas para el polipéptido particular de interés para evitar la precipitación del polipéptido diana. Además de investigarse la calidad del polipéptido diana recuperado para confirmar que no tienen lugar modificaciones del polipéptido diana.

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para purificar un polipéptido heterólogo deseado a partir de caldo u homogeneado de fermentación microbiana en el que éste se produce y se solubiliza, que comprende añadir al caldo u homogeneado una cantidad eficaz de una solución del lactato de etacridina para precipitar la impurezas celulares del hospedador en condiciones en las que la mayor parte del polipéptido sigue siendo soluble, y separar el polipéptido deseado del caldo u homogeneado,
- 10 en el que la temperatura del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina es de temperatura ambiente a 70°C,
- 15 en el que el pH después de la adición del lactato de etacridina no es mayor de 9,
- en el que el polipéptido tiene un pI mayor que el pI medio de la proteínas del hospedador contenidas en las impurezas celulares del hospedador,
- 20 y en el que el polipéptido es un anticuerpo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el caldo u homogenado es de levaduras o procariotas; de bacterias, de eubacterias; de bacterias gram negativas; y/o de *E. coli*.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 ó 2
- (a) en el que el anticuerpo se separa del homogenado;
- (b) y/o en el que el anticuerpo tiene un pI de al menos aproximadamente 7.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo es un polipéptido recombinante.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo de longitud completa.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, que comprende particularmente una cadena ligera, más particularmente una cadena ligera kappa.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub> o fusión F(ab')<sub>2</sub>-cremallera de leucina, especialmente F(ab')<sub>2</sub>.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4
- 40 (a) en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-IgE, anti-CD18, anti-VEGF, anti-factor tisular, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40, o anti-CD11 o un fragmento de anticuerpo; y/o
- (b) en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>, anti-factor tisular F(ab')<sub>2</sub>, anti-factor tisular de longitud completa o anti-VEGF.
- 45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8
- (a) en el que la concentración de lactato de etacridina es 0,1-5% peso/volumen, particularmente 0,4-5% peso/volumen, más particularmente 0,6-5% peso/volumen;
- (b) en el que la conductividad del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina es 1-15 mS;
- 50 (c) en el que el pH del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina es 5-9, particularmente 6-9;
- (d) en el que la temperatura del caldo u homogenado después de la adición del lactato de etacridina es de temperatura ambiente a 65°C mantenida durante 1-60 minutos, más particularmente de 50 a 65°C mantenida durante 1-60 minutos;
- 55 (e) en el que la separación se realiza mediante centrifugado o filtración;
- (f) en el que después de que se separe el anticuerpo del caldo u homogenado, éste se purifica adicionalmente sometiéndolo a cromatografía o filtración; y/o
- 60 (g) en el que el anticuerpo

## ES 2 287 687 T3

- (i) se produce en una fracción soluble antes de la adición del lactato de etacridina, o
- (ii) es insoluble y se disuelve poniéndolo en contacto con un agente solubilizante antes de la adición del lactato de etacridina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

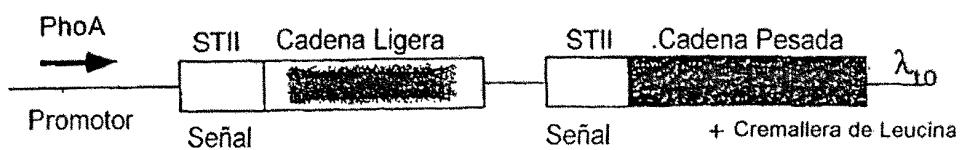
55

60

65

Figura 1. Esquema de los Plásmidos anti-CD 18 Fab' 2 (-cremallera de leucina)

pS1130



pxCD18-7T3

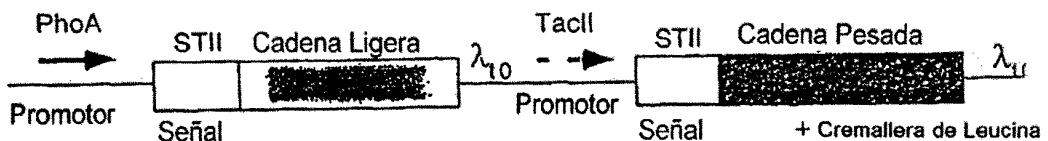


Figura 2

Anti-CD18-7T3.ADN

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA  
GTTGTTATTAAGCTTGCCTAAAAAGAAGAAGAGTCGAATGAACCTGTGTGCCAGGTAGA  
AGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTCGCAATATGGCGAAAAATGACCAACAGCG  
GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCACTCCTGA  
CGACGATAACGGAGCTGCGCGATTACGTAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTA  
AAAAGTTAATCTTCAACAGCTGTCTATAAAGTTGTCAACGGCGAGACTTATAGTCGTT  
TGTGTTTATTTTAACTGTATTGTAACTAGTACGCAAGTTACGGTAAAGGGTATCTA  
GAATTATGAAAAAGAATATCGCATTCTTCTGCATCTATGTTGTTTTTCTAATGCTA  
CAAACCGGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCAGCTCCCTGTCCGCTCTGTGG  
GCGATAGGGTCACCATCACCTGTGTGCCAGTCAGGACATCAACAATTATGAACTGGT  
ATCAACAGAAACCCAGGAAAAGCTCGAAACTACTGATTACTATACTCCACCCCTCCACT  
CTGGAGTCCTCTCGCTCTGGTCTGGTCTGGAGGATTACACTCTGACCATCA  
GCAGTCTGCAACCGGAGGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAGGTAAATACTCTGCCGC  
CGACGGTTCGGACAGGGCAGGAAGGGAGTCACAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT  
TCATCTTCCCGGCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGAAACTGTGGCTCTGTGTGCCCTGC  
TGAATAACTCTATCCCAGAGGGCCAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT  
CGGGTAACTCCCAGGAGGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA  
GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCAACGCCGTGCGAAG  
TCACCCATAGGGCCTGAGCTGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAAAT  
TAAATCCTCTACGCCGAGCAGCATGTGGGAGCTCGTACCCGGGATCTAGGCCTAACG  
CTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTATTGTTGGCAGCGCATCTGACTGCAAGGTGCAC  
CAATGCTTCTGGCGTCAGGCAAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTGCTAAAT  
CACTGCTAACTCGTGTGCTCAAGGCGACTCCGTTCTGGATAATGTTTTGGCGCC  
ACATGCTAAACGGTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAAATTATCATCGAACT  
AGTTTAATGTTGAGGAAATTGTGAGCGGATAACAATTAAAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAAG  
AAGAATATGCGTTCTACTTGCTCTATGTTGCTTTCTATAGCTACAAACCGCTAC  
GCTGAGGTTCAGCTGGAGGTCTGGCGGGTGGCTGGTGCAGCCAGGGCTCACTCCGT  
TTGTOCTGTGCAACTCTGGCTACACCTTACCGAATACACTATGCACTGGATGCGTCA  
GCCCGGGTAAGGGCTGGAATGGGTTGCAAGGGATTAAATCTAAACAGGTGGTACCGAC  
CACAAACAGGGTTCAGGACCGTTCACTATAAGCGTAGATAAAATCCACCGACTACGCC  
TACATGCAAATGAAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTAGATGG  
CGAGGCCGTGAACTACGGCTTGCAGCTCGTAAATTGAGCTCTGGGGTCAAGGAACCCCTG  
GTCACCGTCTCTGGCCTCCACCAAGGGCCATCGCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
AAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
CCGGTGACGGTGTGCAACTCAGGCGCCCTGACCGAGGGGTGCAACACCTCCGGCT  
GTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCAGCGTCCAGCAGC  
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGGCCAGCAACACCRAGGTGAC  
AAGAAAGTGTGAGGCCAAATCTTGTGACAAAAGTCAACAGTGGCTGGGGTGGGG  
GAAGCTGCTGGGGCGCAGCATGAAACAGCTAGAGGACAGGGTCAAGAGCTACTCTCCAAAG  
AACTACCRACCTAGAGAATGAAAGTGGCAAGACTCAGGAGCTTGTGGGGAGGGCTAAGCA  
TGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGGTTGCCGCCGGCTTTTATTGTAACTC  
ATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTAACTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCT  
AACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGACCG  
TCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGTACTGCCGGCCTTGGCGGG  
ATATCGTCCATTCCGACAGCATGCCAGTCACATGGCGTGTGCTAGCGCTATATGCGT

(SEC ID N° 1)

**Figura 3**

Anti-CD18-7T3. Proteína

FIG. 3A: STII + Anti-CD18 de cadena ligera

MKKNTIAFLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWY  
QQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLP  
PTFGQQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C

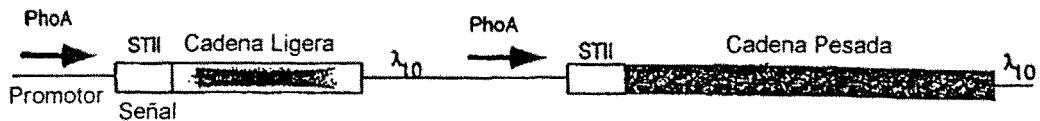
(SEC ID Nº 2)

Fig. 3b: STII + Anti-CD18 de cadena pesada

MKKNTIAFLLASMFVFSIATNAYAEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYTMHW  
MRQAPGKGLEWVAGINPKNGGTSHNQRFMDRFTISVDKSTSTAYMQMNSLRAEDTAVYY  
CARWRGLNYGFDVRYFDVVGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKP  
SNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGRMKQLEDKVEELL SKNYHLENEVARLKK  
LVGER

(SEC ID Nº 3)

Figura 4. Esquema de Plásmidos de IgG1 de Factor anti-Tisular.  
paTF130



pxTF-7T3FL

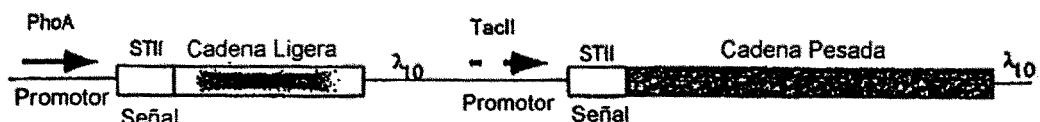


Figura 5

Anti-TF-7T3FL.ADN

GAATTCAACTTCTCCATACTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA  
GTTGTTATTTAAGCTGCCCCAAAAGAAGAAGACTCGAATGAACGTGTCGCAGGTAGA  
AGCTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGAAAATGACCAACAGCG  
GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCTGTACGAGGTAAAGCCGATGCCAGCATTCTGA  
CGACGATACGGAGCTGTCGCATTACGTAAGAAGTATTGAAGCATCCTCGTCAGTA  
AAAAGTTAATCTTTCAACAGCTGTATAAAGTTGTCACGCCAGACTTATAGTCGCTT  
TGTGTTTATTTTAATGTTGTAACTAGTACGCCAGTTACGTAAGGATATCTGCTT  
GAATTATGAAAAGAATATCGCATTCTTCTTCGATCTATGTTGTTTCTATTGCTA  
CAAACGCGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCGCCCTGTGG  
GCGATAGGGTCACCATCACCTGCAGAGCCAGTCGGACATCAAGAGCTATCTGAACCTGG  
ATCAACAGAAACCAGGAAAGCTCCGAAAGTACTGATTACTATGCTACTAGTCTCGCTG  
AAGGAGTCCCTCTCGCTTCTGGATCCGGTCTGGGACGGATTACACTCTGACCATCA  
GCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCCTCAGCACGGAGAGTCTCCAT  
GGACATTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT  
TCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCTCTGTTGTCGCTGC  
TGAATAACTCTATCCCAGAGGGCCAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAAT  
CGGGTAACTTCCCAGAGGGAGGTGTCACAGGACAGGACAGCACCTACAGCTCA  
GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAG  
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAAAT  
TAAATCTCTACGGGGACGCATCGTGGCAGCTCGTACCCGGGATCTAGGCCTAACG  
CTCGGTTGCGGCCGGCGTTTTTATTGTTGCGCAGCGCATTCTGACTGCAAGGTGAC  
CAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGCTGCAAGGTGCTAAAT  
CACTGCATAATTGGTGTGCTCAAGGCCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTGCGCCG  
ACATCATAACGGTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAAATCATCGAACT  
AGTTTAATGTTGGAATTGAGCGGATAACAATTAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAG  
AAGAATATTGCGTCTACTTGCCTCTATGTTGTCCTTCTATAGCTACAAACGCGTAC  
GCTGAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCTGGTGCAGCCAGGGGCTCACTCCGT  
TTGTCCTGTGCACTTCTGGCTTCATATTAAAGGAGTACTACATGCACTGGTCCGTCAG  
GCCGGGGTAAGGGCTTGGGAATTGGTTGAGTGTGATCCAGAGCAAGGCAACACGATC  
TATGACCCGAAGTCCAGGACCGTGCACATAAGCGCTGACAATTCCAAAACACAGCA  
TACCTGCAGATGAAACAGCCTGCGTGGTCAAGGAGACTGCGCTCATTTATTGTCGAGAC  
ACGGCCGCTTACTTCGACTACTGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCTCGGCCCTCC  
ACCAAGGGCCCACCGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGCACA  
GCGGCCCTGGGCTGCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGTGCAGGTGTCGTGGAAC  
TCAGGGCCCTGACCGCGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC  
TACTCCCTAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATC  
TGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGGCCAAATCT  
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCA  
GTCTTCTCTCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC  
ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG  
GACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGAACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG  
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGGCACCCAGGACTGGCTGAATGCAAGGATAC  
AAGTGCAGGTCTTCAACAAAGCCCTCCCCAGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC  
AAAGGGCAGCCCCAGAACCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCGGAAAGAGATGACC  
AAGAACCCAGGTCACTGCCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTG  
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAAGCCTCCGTGCTGGAC  
TCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  
GGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCAAGGCTCTGCACACCAACTACACGCAAG  
AGCCTCTCCCTGTCCTGGTAAATAAGCATGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGG  
TTGCCGCCGGCGTTTTTATTGTTAACTCATGTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTT  
AATGCGTAGTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCACTGCAAGGACCCGTATGAAATCTA  
ACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGCACCGTCACCCCTGGA

(SEC ID N° 4)

**Figura 6**

Anti-TF-7T3FL. Proteína

FIG. 3A: STII + Anti-TF de cadena ligera

MKKNIAPLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWY  
QQKPGKAPKVLIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTIDYTLTISSLQPEDFATYYCLOHGESP  
WTPGQGTKVIEIKRTVAAPSVFIFPPSDBQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE  
C

(SEC ID Nº 5)

Fig. 3b: STII + Anti-TF de cadena pesada

MKKNIAPLLASMFVFSIATNAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYYMHW  
VRQAPGKGLEWVGLIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY  
CARDTAAYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK  
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
IEKTISAKGQPREPQVYTLPPSREEMTIQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEC ID Nº 6)

Fig. 7

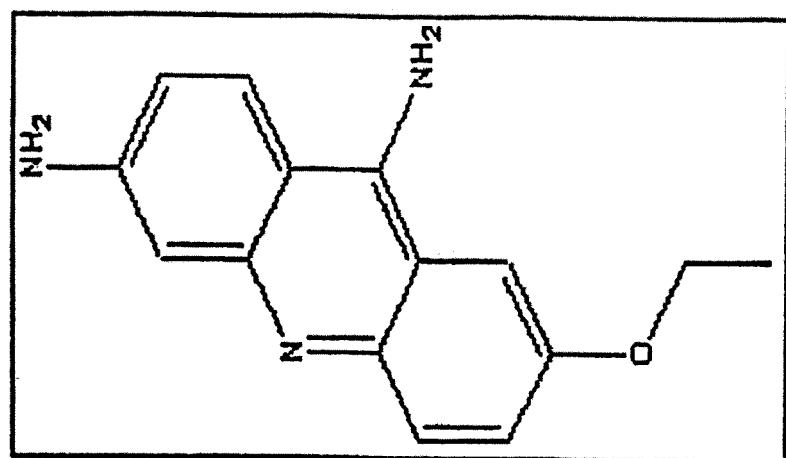
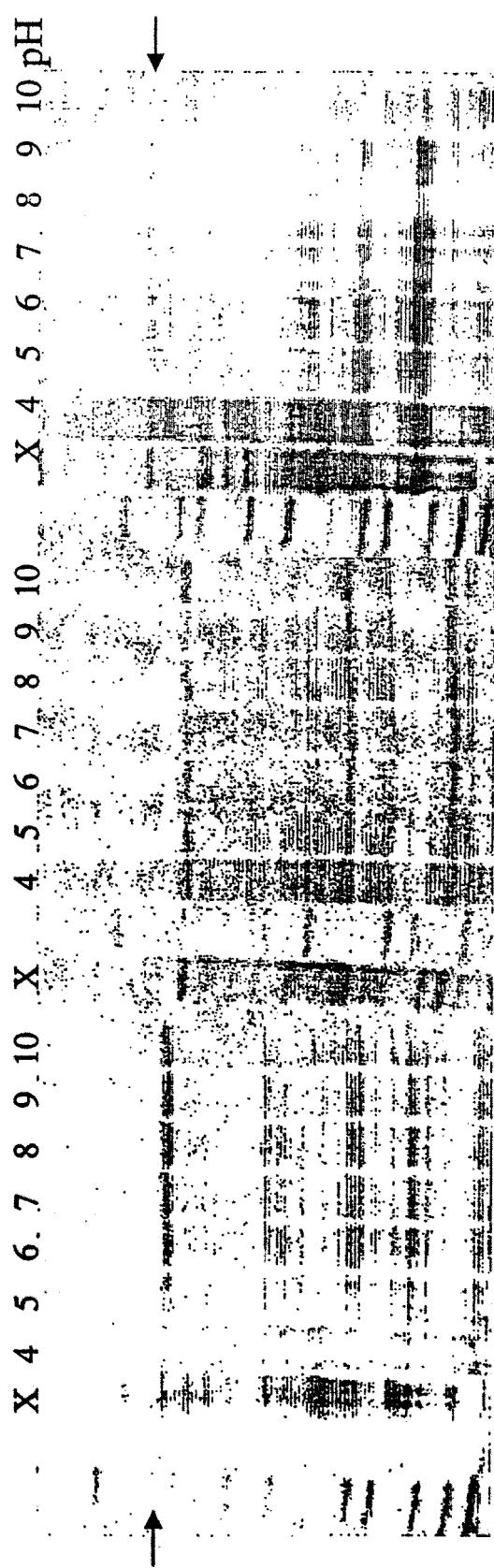


Fig. 8

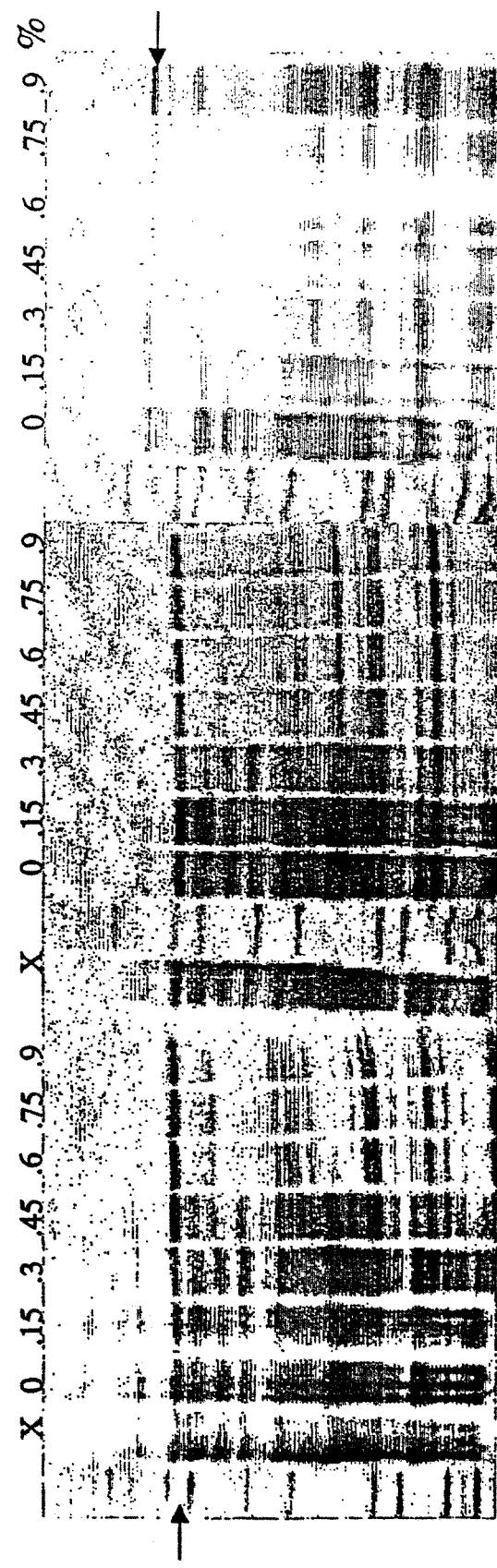


anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>  
FIG 8A

anti-TF F(ab')<sub>2</sub>  
FIG 8B

anti-TF (Ab)  
FIG 8C

Fig. 9

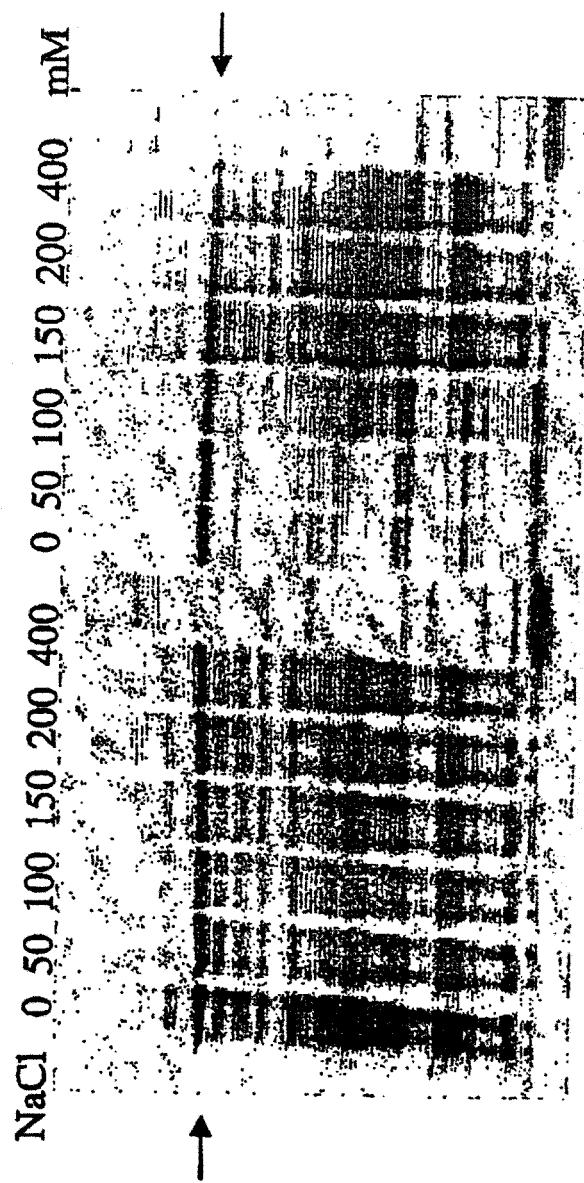


anti-CD18 F(ab')<sub>2</sub>  
FIG 9A

anti-TF F(ab')<sub>2</sub>  
FIG 9B

anti-TF (Ab)  
FIG 9C

Fig. 10



Lactato de  
Etacridina  
Fig. 10B

Agua  
Fig. 10A

Fig. 11

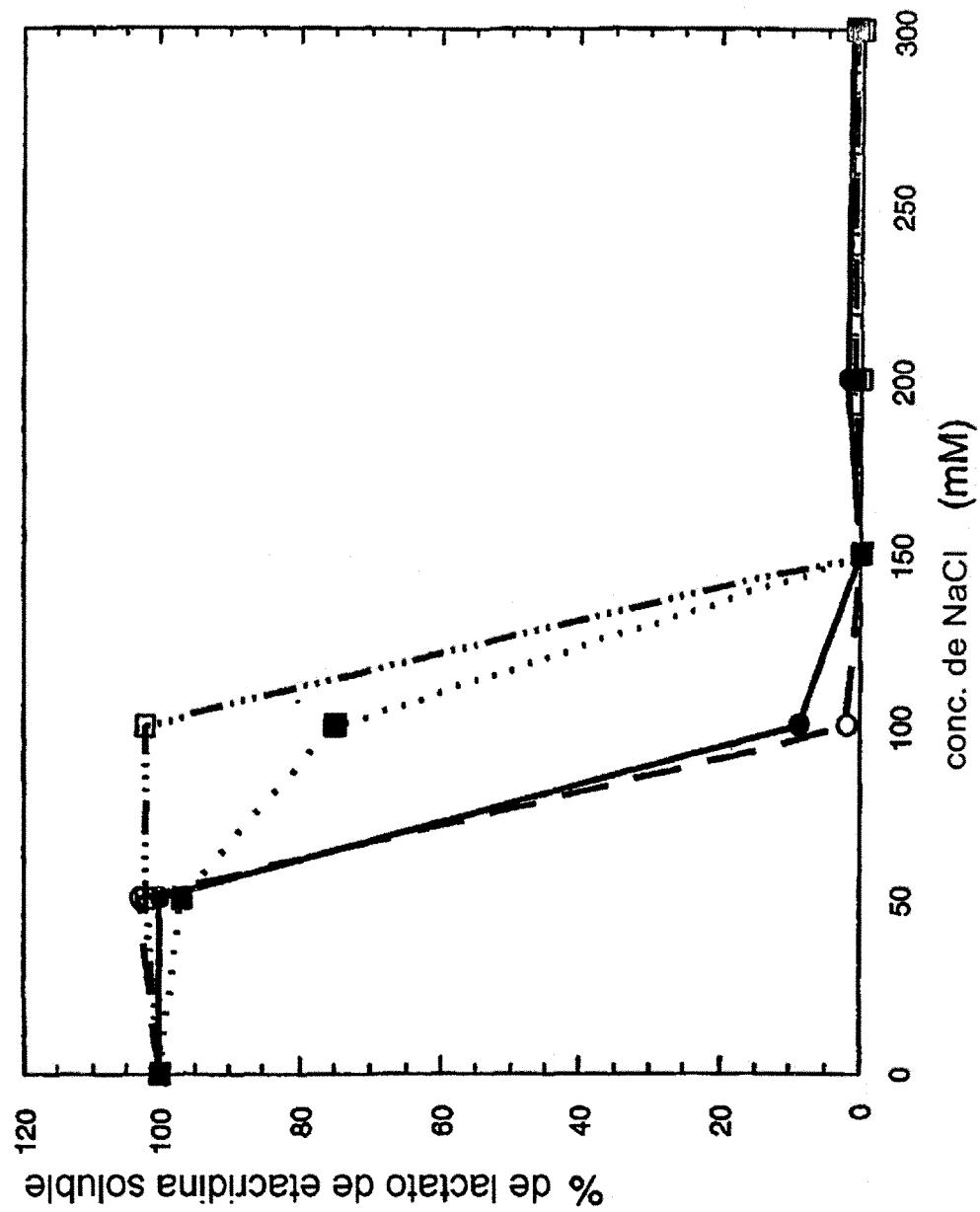


Fig. 12

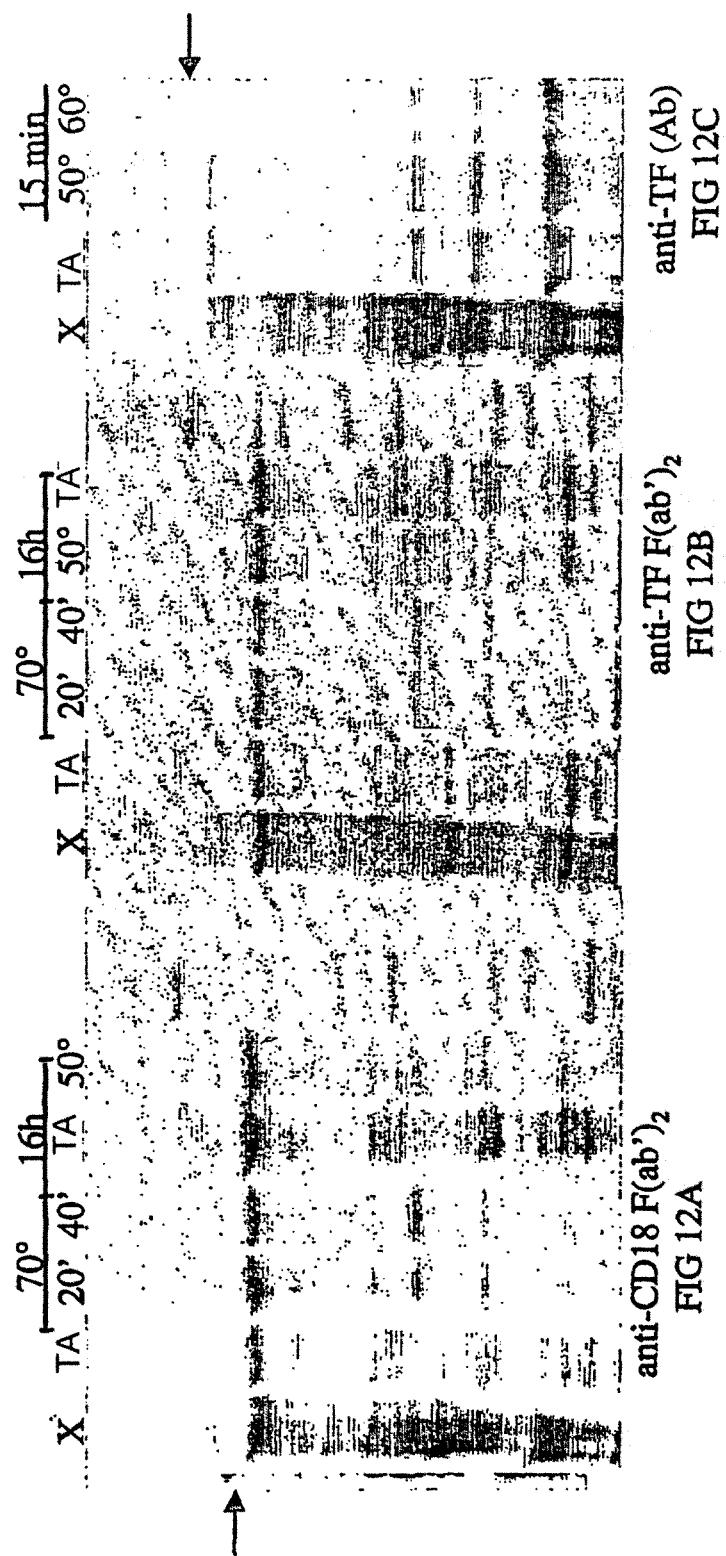
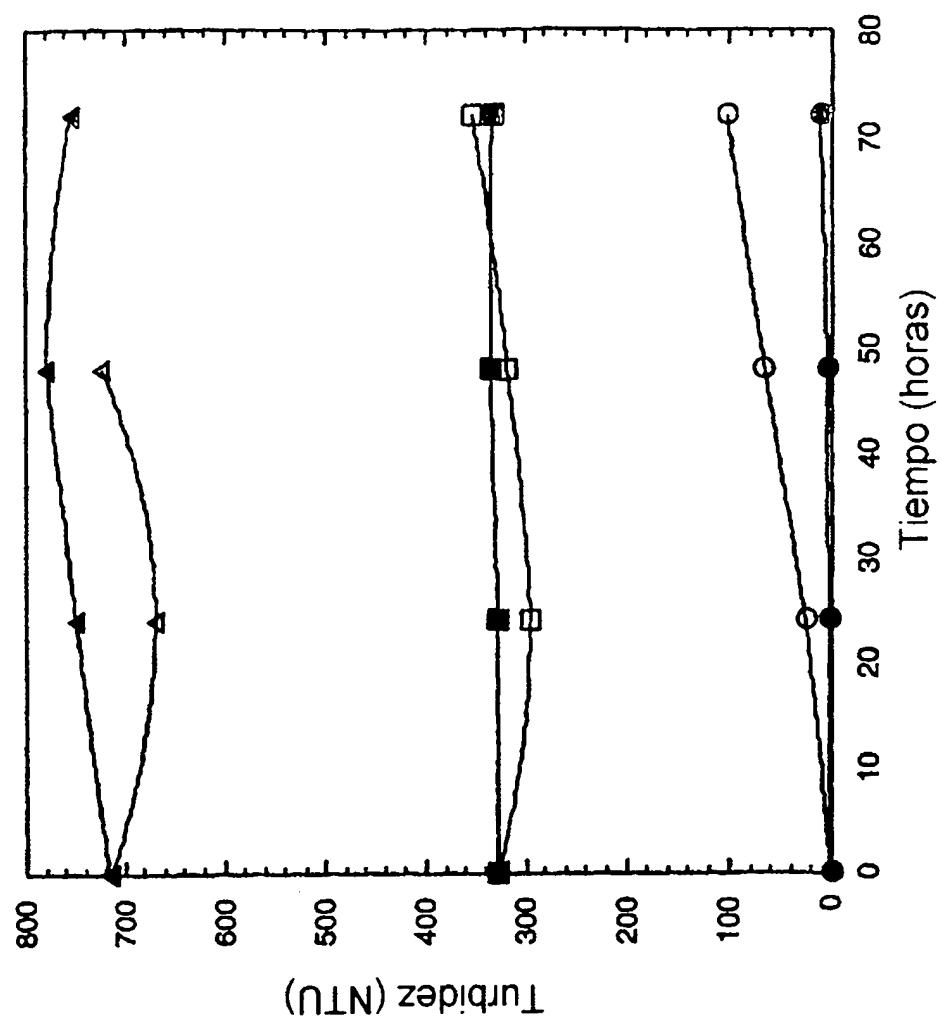


Fig. 13



ES 2 287 687 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

5      <120> PURIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS

10     <130> P1941R1 PCT

10     <140> PCT/US2004/000499

10     <141> 08-01-2004

15     <150> US 60/439.418

15     <151> 09-01-2003

15     <160> 6

20     <210> 1

20     <211> 2700

20     <212> ADN

25     <213> Secuencia artificial

25     <200>

25     <223> la secuencia se sintetiza

30     <400> 1

30        gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50

35        tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100

35        gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgta ctgcaatgct 150

40        tcgcaatatg gcgaaaaatg accaacagcg gttgattgtat caggttagagg 200

40        gggcgctgtta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250

45        gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctcgtcagta 300

45        aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350

50        atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgtt tttgttaacta gtacgcaagt 400

50        tcacgtaaaa agggttatcta gaattatgaa aaagaatatc gcatttcttc 450

55        ttgcatttat gttcgaaaaa tctattgcta caaacgcgtt cgcgtatatc 500

55        cagatgaccc agtccccgag ctcctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550

60        caccatcacc tgtcggtcc gtcaggacat caacaattat ctgaactgg 600

60        atcaacagaa accaggaaaa gctccgaaac tactgatttt ctatacctcc 650

65        accctccact ctggagtcctt ttctcgcttc tctggttctg gttctggggac 700

65        ggattacact ctgaccatca gcagtctgca accggaggac ttctcgcaactt 750

65        attactgtca gcaaggtaat actctgcccc cgacgttcgg acagggcacg 800

# ES 2 287 687 T3

aaggtggaga tcaaacgaac tggctgca ccatctgtct tcatacttccc 850  
5  
gccatctgat gagcagttga aatcttggAAC tgcctctgtt gtgtgcctgc 900  
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 950  
10  
gcctccaaat cggttaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000  
ggacagcacc tacagcctca gcagcacccct gacgctgagc aaagcagact 1050  
acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100  
15  
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150  
acgcccggacg catcggtggcg agctcggtac ccggggatct aggccctaacg 1200  
20  
ctcggttgcc gcccggcggtt ttttattgtt gcccacgcgc atctcgactg 1250  
cacggtgac caatgcttct gggtcgagc agccatcgga agctgtggta 1300  
tggctgtgca ggtcgtaat cactgcataa ttctgtgcgc tcaaggcgca 1350  
25  
ctcccggttct ggataatgtt ttttgcgcgc acatcataac ggttctggca 1400  
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatacgaact agtttaatgt 1450  
gttggaaattgtt gagcggataa caattaagct taggatctag aattatgaag 1500  
30  
aagaatatttgcgtt cgttctact tgcctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550  
aaacgcgtac gctgagggttc agctgggtggaa gtctggcggt ggcctgggtgc 1600  
35  
agccagggggg ctcactccgt ttgtcctgtg caacttctgg ctacaccttt 1650  
accgaataaca ctatgcactg gatgcgtcag gcccgggtta agggcctggaa 1700  
40  
atgggttgca gggattaatc ctaaaaacgg tggtaccagc cacaaccaga 1750  
gttcatggaa cggtttact ataaggcttag ataaatccac cagtagcc 1800  
45  
tacatgcaaa tgaacagcct gcggtgttag gacactgcgc tctattatttgc 1850  
tgcttagatgg cgaggcctga actacggctt tgacgtccgt tattttgacg 1900  
tctggggtca aggaaccctg gtcaccgtct cctcgccctc caccaaggc 1950  
50  
ccatcggtct tccccctggc accctccctcc aagagccacccctt ctggggcac 2000  
agcggccctg gggtgcctgg tcaaggacta cttcccccggaa ccgggtgacgg 2050  
55  
tgtcggtggaa ctcaggcgcc ctgaccagagc gcgtgcacac cttcccggtct 2100  
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc 2150  
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 2200  
60

## ES 2 287 687 T3

ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 2250  
actcacacat gcccggcgtg cccagcacca gaactgctgg gcggcogcat 2300  
5 gaaacagcta gaggacaagg tcgaagagct actctccaag aactaccacc 2350  
tagagaatga agtggcaaga ctcaaaaagc ttgtcgggga gcgctaagca 2400  
10 tgcgacggcc ctagagtccc taacgctcgg ttgccgcccgg gcgttttta 2450  
ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagctt aatgcggtag 2500  
15 tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta 2550  
acaatgcgct catcgatc ctcggcacccg tcaccctgga tgctgttaggc 2600  
ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgcca 2650  
20 ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt 2700

25 <210> 2

25 <211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> la secuencia se sintetiza

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 287 687 T3

<400> 2

5	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe	1	5	10	15
10	Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser	20		25	30
15	Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr	35		40	45
20	Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln	50		55	60
25	Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser	65		70	75
30	Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	80		85	90
35	Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp	95		100	105
40	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr	110		115	120
45	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	125		130	135
50	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	140		145	150
55	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg	155		160	165
60	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly	170		175	180
65	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	185		190	195
70	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	200		205	210
75	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	215		220	225
80	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	230		235	

<210> 3

<211> 300

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

## ES 2 287 687 T3

&lt;400&gt; 3

5	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe	1	5	10	15
	Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	20	25	30	
10	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys	35	40	45	
	Ala Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Met	50	55	60	
15	Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Asn	65	70	75	
20	Pro Lys Asn Gly Gly Thr Ser His Asn Gln Arg Phe Met Asp Arg	80	85	90	
	Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln	95	100	105	
25	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	110	115	120	
	Arg Trp Arg Gly Leu Asn Tyr Gly Phe Asp Val Arg Tyr Phe Asp	125	130	135	
30	Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	140	145	150	
	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	155	160	165	
35	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	170	175	180	
40	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	185	190	195	
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	200	205	210	
45	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr	215	220	225	
50	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys	230	235	240	
	Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	245	250	255	
55	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Arg Met Lys	260	265	270	
	Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His	275	280	285	
60	Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg	290	295	300	

# ES 2 287 687 T3

<210> 4

<211> 3100

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 4

15 **gaattcaact tctccataact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc** 50

**tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat** 100

**gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgta ctgcaatgt** 150

**tcgcaatatg ggcacaaatg accaacagcg gttgattgat caggttagagg** 200

**gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg** 250

**gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctgtcagta** 300

**aaaagttaat ctttcaaca gctgtcataa agttgtcactg gccgagactt** 350

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 287 687 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtacta gtacgcaagt 400  
tcacgtaaaa agggtatcta gaattatgaa aaagaatatc gcatttcttc 450  
ttgcatctat gttcgaaaa tctattgcta caaacgcgta cgctgatatc 500  
cagatgaccc agtccccgag ctccctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550  
caccatcacc tgcagagcca gtcgcgacat caagagctat ctgaactgg 600  
atcaacagaa accagaaaaa gtcggaaag tactgattt aatgtact 650  
agtctcgctg aaggagtccc ttctcgcttc tctggatccg gttctgggac 700  
ggattacact ctgaccatca gcagtctgca gccagaagac ttgcgaactt 750  
attactgtct tcagcacgga gagtctccat ggacatttgg acagggtacc 800  
aaggtggaga tcaaacgaac tggctgca ccattctgtct tcattttccc 850  
gccatctgtat gagcagttga aatctggaaac tgcttctgtt gtgtgcctgc 900  
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 950  
gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000  
ggacagcacc tacagcctca gcagcaccc gacgctgagc aaagcagact 1050  
acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100  
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150  
acgcoggacg catcggtggcg agctcggtac ccggggatct aggcctaacg 1200  
ctcggttgcc gceggcggtt ttttattgtt gccgacgcgc atctcgactg 1250  
cacggtgac caatgtttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta 1300  
tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttctgtgtgc tcaaggcgca 1350  
ctcccgttct ggataatgtt ttttgcggcc acatcataac ggttctggca 1400  
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcattcaact agtttaatgt 1450  
gtgaaattgt gagcggataa caatataact taggatctag aattatgaag 1500  
aagaatattt cgttcctact tgcctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550  
aaacgcgtac gctgagggttc agctggtgga gtctggcggt ggcctggcgc 1600  
agccaggggg ctcactccgt ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaatatt 1650  
aaggagtaact acatgcactg ggtccgtcag gccccgggtt agggcctggta 1700  
atgggttggta ttgattgtac cagagoaagg caacaogatc tatgaccgta 1750

ES 2 287 687 T3

5  
atgtccagga ccgtgccact ataaggcgtg acaattccaa aaacacagca 1800  
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgag gacactgccc tctattattg 1850  
tgctcgagac acggccgctt acttcgacta ctggggtcaa ggaaccctgg 1900  
tcaccgtctc ctgcgcctcc accaaggccc catcggtctt cccccctggca 1950  
ccctcctcca agagcacctc tggggcaca gcggccctgg gctgcctgg 2000  
caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggccccc 2050  
tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 2100  
tactccctca gcagcgtggt gactgtgccc tctagcagct tgggcaccca 2150  
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca 2200  
agaaaagttga gcccaaatct tttttttttt ctcacacatg cccaccgtgc 2250  
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtttccctct tccccccaaa 2300  
acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg 2350  
tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgt 2400  
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaaagaca aagccgcggg aggagcagta 2450  
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctg caccaggact 2500  
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 2550  
gccccccatcg agaaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 2600  
acaggtgtac accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg 2650  
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccaagcga catgcgggt 2700  
gagttggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 2750  
cgtgctggac tccgacggct cttttttctt ctacagcaag ctcaccgtgg 2800  
acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtct ttcatgttc cgtgatgtat 2850  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agccctccccc tttttttttt 2900  
taaataagca tgccacggcc ctagatccc taacgcttgg ttggcccggtt 2950  
ggttttttttta ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt 3000  
aatgcggtag tttatcacag taaaattgtt aacgcagtca ggcaccgtgt 3050  
atgaaatcta acaatgcgtt ctagatccc ctcggcaccgg tcaccctggaa 3100

<210> 5

60 <211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> la secuencia se sintetiza

# ES 2 287 687 T3

<400> 5

5	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe 1 5 10 15
10	Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser 20 25 30
15	Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr 35 40 45
20	Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln 50 55 60
25	Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr 65 70 75
30	Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser 80 85 90
35	Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp 95 100 105
40	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp Thr 110 115 120
45	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 125 130 135
50	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 140 145 150
55	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg 155 160 165
60	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly 170 175 180
65	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 185 190 195
70	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 200 205 210
75	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser 215 220 225
80	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 230 235

55 <210> 6

<211> 470

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

## ES 2 287 687 T3

&lt;400&gt; 6

5	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe	1	5	10	15
	Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser	20	25	30	
10	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys	35	40	45	
	Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Glu Tyr Tyr Met His Trp Val	50	55	60	
15	Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile Asp	65	70	75	
20	Pro Glu Gln Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp Arg	80	85	90	
	Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln	95	100	105	
25	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	110	115	120	
	Arg Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	125	130	135	
30	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	140	145	150	
	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	155	160	165	
35	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	170	175	180	
40	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	185	190	195	
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	200	205	210	
45	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	215	220	225	
50	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro	230	235	240	

55

60

65

ES 2 287 687 T3

	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
	245	250	255
5	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
	260	265	270
10	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
	275	280	285
	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
	290	295	300
15	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
	305	310	315
20	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	320	325	330
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	335	340	345
25	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	350	355	360
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	365	370	375
30	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	380	385	390
35	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	395	400	405
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	410	415	420
40	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	425	430	435
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
45	440	445	450
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	455	460	465
50	Leu Ser Pro Gly Lys		
	470		

55

60

65