

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 883**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
G01N 30/02	(2006.01)
G01N 31/00	(2006.01)
B01D 15/36	(2006.01)
B01D 15/38	(2006.01)
G01N 30/88	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011** E 17167800 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** EP 3299380

54 Título: **Procedimientos de purificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

25.05.2010 US 348143 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.12.2024

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LIU, HUI F.;
KELLEY, BRIAN DAVID;
MYERS, DEANNA E.;
MCCOOEY, BETH y
PETTY, KRISTA MARIE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 991 883 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

Procedimientos de purificación de polipéptidos

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica un beneficio prioritario de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/348.143 presentada el 25 de mayo de 2010.

10 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo monoclonal a partir de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante y formulaciones que comprenden el anticuerpo purificado por los procedimientos.

15 **Antecedentes de la invención**

La purificación económica a gran escala de los polipéptidos es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. Generalmente, los polipéptidos se producen mediante cultivo celular, usando líneas de células de mamífero o bacterianas genomanipuladas para producir el polipéptido de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen de ese polipéptido. Puesto que las líneas celulares usadas son organismos vivos, se deben alimentar con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, habitualmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. Es deseable separar el polipéptido de interés de una mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células.

La separación del polipéptido de interés de otros productos producidos por la célula se intenta habitualmente usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de polipéptidos en base a su carga, grado de hidrofobicidad, tamaño o la interacción específica entre el polipéptido de interés y un agente de captura inmovilizado. Existen diferentes resinas de cromatografía disponibles para cada una de estas técnicas, permitiendo una adaptación exacta del esquema de purificación al polipéptido particular implicado. La esencia de cada uno de estos procedimientos de separación es que los polipéptidos se pueden hacer descender a diferentes velocidades por una columna larga, logrando una separación física que aumenta a medida que van bajando por la columna, o se pueden adherir selectivamente al medio de separación, siendo entonces eluidos diferencialmente por diferentes disolventes. En algunos casos, el polipéptido de interés se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y el polipéptido de interés no, es decir, el polipéptido de interés está presente en el "flujo directo". Brown *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem* 2010, 56, 59-70, publicaron un estudio que examinaba una cromatografía frontal mediante la sobrecarga de adsorbentes de membrana de intercambio iónico como etapa de purificación final en la producción de anticuerpos monoclonales.

La purificación a gran escala y rentable de un polipéptido con una pureza suficiente para su uso como agente terapéutico humano sigue siendo un desafío formidable.

45 **Breve resumen**

Se proporcionan en el presente documento procedimientos para purificar un anticuerpo, que es un anticuerpo monoclonal, a partir de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, en los que el procedimiento comprende cargar la composición en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga superior a aproximadamente 150 g/l de material de intercambio catiónico, en el que el material de intercambio catiónico son partículas de resina.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el anticuerpo tiene un pl de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10. En algunos modos de realización, el anticuerpo tiene un pl de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9.

En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de IgG. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el al menos un contaminante es uno cualquiera o más entre proteína de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina y contaminante vírico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, la densidad de carga está entre

aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 2000 g/l. En algunos modos de realización, la densidad está entre aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 1000 g/l. En algunos modos de realización, la densidad está entre aproximadamente 500 g/l y aproximadamente 700 g/l.

5 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el material de intercambio catiónico comprende un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico. En algunos modos de realización, el grupo funcional es sulfopropilo, sulfoetilo, sulfoisobutilo o carboxilo. El material de intercambio catiónico son partículas de resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es Mustang S, Sartobind S, SO3 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros HS50, Poros HS20, sulfopropil-Sepharose Fast Flow (SPSFF), SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel SO3 o Fractogel COO. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es Poros HS50.

15 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el procedimiento comprende el uso de un tampón de equilibrado, un tampón de lavado y/o un tampón de carga con el material de intercambio catiónico, y la conductividad del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 25 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 3 mS/cm y 8 mS/cm.

20 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el procedimiento comprende el uso de un tampón de equilibrado, un tampón de lavado y/o un tampón de carga con el material de intercambio catiónico, y el pH del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5.

25 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga con el material de intercambio catiónico son los mismos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga con el material de intercambio catiónico son diferentes.

30 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el procedimiento comprende además someter la composición que comprende el polipéptido a una o más etapas de purificación adicionales antes o después de las etapas (a) y (b). En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el procedimiento comprende además recuperar el polipéptido purificado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos, el procedimiento comprende además combinar el polipéptido purificado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1A-D muestran los cromatogramas obtenidos usando Poros HS50, SPSFF, SO3 Monolith y Mustang S para la purificación del anticuerpo anti-CD11a.

40 La FIG. 2 muestra las C/C_0 (la concentración de AcM (anticuerpo monomérico)) y C/C_0 (la concentración de proteína de ovario de hámster chino ("CHOP")) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (g/l de CV o MV) usando SPSFF, Poros HS50, Mustang S y SO3 monolith. C es la concentración de AcM o CHOP en la fracción recogida y C_0 es la concentración de AcM o CHOP en la carga.

45 La FIG. 3 muestra las C/C_0 (concentración de AcM) y C/C_0 (la concentración de proteína de alto peso molecular ("HMW")) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (g/l de CV o MV) usando SO3 monolith, Mustang S, SPSFF y Poros HS50. C es el porcentaje de AcM o HMW en la fracción recogida y C_0 el porcentaje de AcM o HMW en la carga.

50 Las FIG. 4A-D muestran las C/C_0 (concentración de AcM), C/C_0 (concentración de HMW1) y C/C_0 (concentración de HMW2) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (g/l de CV o MV) usando SO3 monolith, Mustang S, SPSFF y Poros HS50.

55 La FIG. 5A muestra el cromatograma de HMW y AcM en el producto que comprende anticuerpo anti-CD11a cargado usando Poros HS50; la FIG. 5B muestra el cromatograma de HMW y AcM en el conjunto de elución usando Poros HS50 (la figura interior muestra una sección ampliada de los picos); la FIG. 5C muestra el % de HMW acumulado en el conjunto de flujo directo ("FT") y el % de HMW en las fracciones de FT con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (g/l de CV) usando Poros HS50.

60 La FIG. 6A muestra los cromatogramas del conjunto de FT con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido usando una columna SPSFF; la FIG. 6B muestra el % de HMW acumulado en el conjunto de FT y el % de HMW en las fracciones de FT con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (mg/ml de CV) usando SPSFF; la FIG. 6C muestra el % de HMW con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD11a recogido (mg/ml) usando SPSFF.

ES 2 991 883 T3

- Las FIG. 7A-D muestran los cromatogramas obtenidos usando Poros HS50, SPSFF, SO3 Monolith y Mustang S para la purificación de anticuerpo anti-VEGF.
- 5 La FIG. 8 muestra la C/C_0 (concentración de AcM) de anticuerpo anti-VEGF con una cantidad variable del producto cargado (g/l de CV o MV) usando Poros HS50, Mustang S, SO3 monolith y SPSFF.
- La FIG. 9 muestra la C/C_0 (concentración de CHOP) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV o MV) usando SPSFF, Sartobind S, Poros HS50, Mustang S y SO3 monolith.
- 10 La FIG. 10 muestra la cantidad de ADN (pg/mg) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV o MV) usando SPSFF, Poros HS50, Mustang S y SO3 monolith.
- 15 La FIG. 11 muestra la C/C_0 (concentración de HMW) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV o MV) usando SPSFF, Sartobind S, Poros HS50 con AcM diluido, Poros HS50, Mustang S y SO3 monolith.
- 20 Las FIG. 12A-B muestran las C/C_0 (concentración de HMW1) y C/C_0 (concentración de HMW2) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV o MV) usando SPSFF, Poros HS50 con AcM diluido, Poros HS50, Mustang S y SO3 monolith.
- Las FIG. 13A-E muestran el % de HMW unido a la resina (Poros HS50, SE HiCap, SPSFF, SPXL y Capto S) usando el producto que comprende anticuerpo anti-CD20 a diversos pH y concentraciones salinas.
- 25 Las FIG. 14A-E muestran el % de CHOP unido a la resina (Poros HS50, SE HiCap, SPSFF, SPXL y Capto S) usando el producto que comprende anticuerpo anti-CD20 a diversos pH y concentraciones salinas.
- La FIG. 15 muestra la C/C_0 (% de concentración de HMW) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD20 recogido (g/l de CV) usando Poros HS50 y Capto S.
- 30 La FIG. 16 muestra la HMW acumulada (%) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD20 recogido (g/l de CV) usando Poros HS50 y Capto S.
- La FIG. 17 muestra la C/C_0 (concentración de CHOP) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD20 recogido (g/l de CV) usando Poros HS50 y Capto S.
- 35 La FIG. 18 muestra la CHOP acumulada (ppm) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-CD20 recogido (g/l de CV) usando Poros HS50 y Capto S.
- 40 Las FIG. 19A-B muestran los cromatogramas de la señal de UV obtenida a 280 nm representada frente al tiempo de ejecución (FIG. 19A) y frente al volumen de carga del producto (FIG. 19B) usando SPSFF a diversos caudales para la purificación de anticuerpo anti-VEGF.
- La FIG. 20 muestra las C/C_0 (concentración de AcM) y C/C_0 (concentración de CHOP) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (mg/ml de CV) usando SPSFF a diversos caudales.
- 45 La FIG. 21 muestra la cantidad de ADN (pg/mg) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (mg/ml de CV) usando SPSFF a diversos caudales.
- 50 La FIG. 22 muestra la C/C_0 (concentración de HMW) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV) usando SPSFF a diversos caudales.
- La FIG. 23 muestra las C/C_0 (concentración de HMW (%)), C/C_0 (concentración de CHOP (ppm)) y la cantidad de ADN (pg/mg) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV) usando Poros HS50 a diversos caudales.
- 55 La FIG. 24 muestra los cromatogramas obtenidos usando Poros HS50 a diversas conductividades de carga para la purificación de anticuerpo anti-VEGF.
- 60 Las FIG. 25A-B muestran los cromatogramas del eluato de la elución (pico P1) y el eluato de la limpieza (pico P2) obtenidos usando Poros HS50 cargada con el producto que comprende anticuerpo anti-VEGF a diversas conductividades de carga.
- 65 La FIG. 26 muestra la cantidad de CHOP en la fracción (ppm) con una cantidad variable de CHOP cargada (ug/ml de CV) usando Poros HS50 a diversas conductividades de carga para la purificación de anticuerpo anti-VEGF.

La FIG. 27 muestra la C/C₀ (concentración de HMW) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (mg/ml de CV) usando Poros HS50 a diversas conductividades de carga.

5 Las FIG. 28A-B muestran la cantidad de ADN (pg/ml) con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (g/l de CV) a diversas conductividades de carga y diversos caudales (diferente cantidad de ADN en la carga (pg/mg) para una conductividad de carga diferente).

10 La FIG. 29 muestra la cantidad de ADN (pg/ml) y la concentración de anticuerpo con una cantidad variable del producto que comprende anticuerpo anti-VEGF recogido (mg/ml de CV) usando Poros HS50 eluido con una elución de gradiente lineal de sal.

15 La FIG. 30 muestra las C/C₀ (concentración de HMW (%)), C/C₀ (concentración de CHOP (ppm)) y la cantidad de ADN (pg/mg) con una cantidad variable del producto que contiene anticuerpo anti-VEGF cargado (g/l de CV) usando Poros HS50 con una altura de lecho de 4,6 cm o 14,2 cm.

Las FIG. 31A-F muestran el % de recuperación de AcM para anticuerpo anti-VEGF (en la fracción de FT), anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20, usando resina Capto Adhere a diversos pH y conductividades (con NaAC o glicina-HCl como sal tampón).

20 Las FIG. 32A-F muestran el % de HMW unido usando resina Capto Adhere a diversos pH y conductividades (con NaAC o glicina-HCl como sal tampón) para anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20.

Las FIG. 33A-F muestran el % de CHOP unido usando resina Capto Adhere a varios pH y conductividades (con NaAC o glicina-HCl como sal tampón) para anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20.

25 La FIG. 34 muestra los cromatogramas obtenidos usando la columna Capto Adhere acoplada y la columna Poros HS50 para la purificación de anticuerpo anti-CD11a.

30 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

35 El término "polipéptido" o "proteína" significa una secuencia de aminoácidos cuya longitud de cadena es suficiente para producir los niveles más altos de estructura terciaria y/o cuaternaria. Así, las proteínas se distinguen de los "péptidos" en que éstos son también moléculas basadas en aminoácidos que no tienen tal estructura. Típicamente, una proteína para uso en el presente documento tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 5-20 kDa, como alternativa de al menos aproximadamente 15-20 kDa, preferentemente de al menos aproximadamente 20 kDa. "Péptido" significa una secuencia de aminoácidos que generalmente no exhibe el nivel más alto de estructura terciaria y/o cuaternaria. Los péptidos tienen generalmente un peso molecular de menos de 40 aproximadamente 5 kDa.

Los ejemplos de polipéptidos abarcados dentro de la definición del presente documento incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulación tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasas u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada en función de su activación, expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno citotóxico asociado a linfocitos T (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofinas 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de 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-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del

SIDA; proteínas de transporte; receptores de direccionamiento; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2, HER3 o HER4; inmunoadesinas y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, de unión a una proteína, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.

Polipéptido "purificado" (por ejemplo, anticuerpo) significa que el polipéptido ha aumentado su pureza, de tal manera que existe en una forma que es más pura que en su entorno natural y/o cuando inicialmente se sintetiza y/o se amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

El término "epítipo marcado" cuando se usa en el presente documento hace referencia a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido fusionado con un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que se puede elaborar un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera en la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

"Activo" o "actividad" para los propósitos del presente documento hace referencia a la forma o formas de un polipéptido que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo o de origen natural, en el que actividad "biológica" hace referencia a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por un polipéptido nativo o de origen natural que no sea la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido nativo o de origen natural, y una actividad "inmunológica" hace referencia a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido nativo o de origen natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido nativo. De una manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido nativo. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula candidata a agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" hace referencia a la lisis de una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo)) complejoado con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Un polipéptido "que se une a" un antígeno de interés, por ejemplo, una diana antigénica polipeptídica asociada a tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de tal modo que el polipéptido es útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de una célula o un tejido que expresa el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otros polipéptidos. En tales modos de realización, el grado de unión del polipéptido a un polipéptido "no diana" será inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del polipéptido a su polipéptido diana particular, determinado mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Con respecto a la unión de un polipéptido a una molécula diana, el término "unión específica a" o "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una polipéptido diana particular significa que una unión es cuantificablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica que la unión es específica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente con un exceso de diana no marcada.

Un polipéptido que "inhibe el crecimiento de células tumorales" o un polipéptido "inhibidor del crecimiento" es aquel que da como resultado una inhibición mensurable del crecimiento de células cancerosas. En un modo de realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de polipéptido de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 µg/ml o de aproximadamente 0,5 nM a aproximadamente 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al

polipéptido. El polipéptido inhibe el crecimiento *in vivo* si la administración del polipéptido a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado una reducción en el tamaño del tumor o la proliferación de células tumorales en un periodo de aproximadamente 5 días a aproximadamente 3 meses desde la primera administración del polipéptido, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 días.

Un polipéptido que "induce la apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada determinada por la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, el encogimiento celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). Preferentemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colon o vejiga. Existen varios procedimientos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidilserina (PS) se puede medir mediante unión a anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar a través del escalonamiento de ADN y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación del ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en las células hipodiploides. Preferentemente, el polipéptido que induce la apoptosis es aquel que da como resultado de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 veces, y lo más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces más inducción de unión a anexina respecto a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

Un polipéptido que "induce la muerte celular" es aquel que causa que una célula viable se convierta en no viable. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunitarias para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así, el ensayo para la muerte celular se puede realizar usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. Para determinar si el polipéptido es capaz de inducir la muerte celular, se puede valorar la pérdida de integridad de la membrana tal como se evaluó mediante captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.* *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) o 7AAD con respecto a las células no tratadas.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina de origen natural que tienen estructuras variables, todas basadas en el plegamiento de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras" que están unidas por enlaces disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera en sí comprende una región "constante" (C) y una región "variable" (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte estructural y función en interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunitarios. La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo viene determinada por las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente entre los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas por tres regiones hipervariables que forman bucles que se conectan con y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a 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 exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada región V comprende típicamente tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR", cada una de las cuales contiene un "bucle hipervariable") y cuatro regiones marco. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado particular, por lo tanto, incluirá típicamente las tres CDR y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones marco intercaladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos clásicos de cuatro cadenas tienen sitios de unión a antígeno que están definidos por los dominios V_H y V_L en cooperación. Ciertos anticuerpos,

tales como anticuerpos de camello y tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en sitios de unión formados únicamente por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas genomanipuladas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre V_H y V_L .

El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en su 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 uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables, en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables que forman bucles que se conectan con y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a 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 exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, hace referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, en torno a aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio V_L y en torno a aproximadamente los residuos 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio V_L y los residuos 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio V_H ; (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Los residuos "marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina genera un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación del presente documento para un Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM,

y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, el polipéptido de Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y en Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente 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 al no estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento se pueden elaborar por el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden elaborar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo de las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, tales como babuino, macaco Rhesus o macaco cangrejero) y secuencias de regiones constantes humanas (patente de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se elaboran para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, a excepción de la sustitución o sustituciones de FR señaladas anteriormente. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse 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).

Para los propósitos del presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

En algunos modos de realización, las "funciones efectoras" del anticuerpo hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis y la regulación negativa de receptores de superficie celular.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" hacen referencia a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (Natural Killer, NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos a una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede valorar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunos modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes las PBMC y los linfocitos NK.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos en el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término "secuencial" como se usa en el presente documento hace referencia a que no hay una etapa de cromatografía entre las etapas (a) y (b) del procedimiento.

El término "continuo" como se usa en el presente documento hace referencia a tener el material de intercambio catiónico y el material de modo mixto directamente conectados o a algún otro mecanismo que permita el flujo continuo entre el material de intercambio catiónico y el material de modo mixto.

"Contaminantes" hace referencia a materiales que son diferentes del producto polipeptídico deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula hospedadora tales como CHOP; proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componente de medios de cultivo celular, etc.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen los aspectos y variaciones de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en".

II. Procedimientos de purificación

Se proporcionan en el presente documento procedimientos como se define en las reivindicaciones para purificar un polipéptido que es un anticuerpo monoclonal a partir de una composición que comprende el polipéptido y al menos un contaminante. En particular, los procedimientos comprenden el uso de un material de intercambio catiónico sobrecargado. Los procedimientos comprenden cargar la composición en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga superior a aproximadamente 150 g/l de material de intercambio catiónico.

Los procedimientos de purificación proporcionados en el presente documento comprenden además cargar la composición en un material de modo mixto. Por ejemplo, en algunos modos de realización, los procedimientos comprenden las etapas secuenciales de (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga superior a aproximadamente 150 g/l de material de intercambio catiónico y (b) cargar una composición recuperada del material de intercambio catiónico en un material de modo mixto. En otro ejemplo, en algunos modos de realización, los procedimientos comprenden las etapas secuenciales de (a) cargar la composición en un material de modo mixto y (b) cargar una composición recuperada del material de modo mixto en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga superior a aproximadamente 150 g/l de material de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, las etapas secuenciales son continuas. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, las etapas secuenciales son discontinuas. En algunos modos de realización, la purificación continua utiliza el mismo caudal, conductividad y/o pH.

Los procedimientos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de cargar la composición en un material de cromatografía de afinidad por proteína A. La etapa de cargar la composición en un material de cromatografía de afinidad por proteína A se efectúa generalmente, pero no necesariamente, antes de la otra u otras etapas de cromatografía. En algunos modos de realización, la etapa de cargar la composición en un material de cromatografía de afinidad por proteína A se puede combinar con las etapas secuenciales de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado y de modo mixto, en cualquier orden. En algunos modos de realización, las etapas secuenciales son continuas. En algunos modos de realización, la purificación continua utiliza el mismo caudal, conductividad y/o pH.

El material de intercambio catiónico es una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa que pasa sobre o a través de la fase sólida. El material de intercambio catiónico son partículas de resina. El material de intercambio catiónico puede comprender un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico tal como, pero sin limitación, sulfonato, carboxílico, ácido carboximetilsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo, carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo u ortofosfato.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico puede utilizar un material de cromatografía convencional o un material de cromatografía convectiva. Los materiales de cromatografía convencionales incluyen, por ejemplo, materiales perfusivos (por ejemplo, resina de poli(estireno-divinilbenceno)) y materiales difusivos (por ejemplo, resina de agarosa reticulada). En algunos modos de realización, la resina de poli(estireno-divinilbenceno) puede ser la resina Poros HS. La resina Poros HS puede ser de partículas Poros HS de 50 µm o Poros HS de 20 µm. En algunos modos de realización, la resina de agarosa reticulada puede ser resina sulfopropil-Sepharose Fast Flow ("SPSFF"). El material de cromatografía convectiva puede ser un material de membrana (por ejemplo, polietersulfona) o monolítico (por ejemplo, polímero reticulado). La membrana de polietersulfona puede ser Mustang S. El material monolítico de polímero reticulado puede ser poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno) reticulado, por ejemplo, monolith SO3.

Los ejemplos de materiales de intercambio catiónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, Mustang S, Sartobind S, SO3 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros HS50, Poros HS20, SPSFF, SP Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel SO3 o Fractogel COO. En algunos

modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico es Poros HS50. En algunos modos de realización, la resina Poros HS puede ser partículas Poros HS de 50 µm o Poros HS de 20 µm.

5 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de una o más de las siguientes funcionalidades: intercambio aniónico, enlace de hidrógeno e interacciones hidrófobas. En algunos modos de realización, el material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de generar intercambio aniónico e interacciones hidrófobas. El material de modo mixto puede contener N-bencil-N-metiletanolamina, 4-mercaptoetilpiridina,
10 hexilamina o fenilpropilamina como ligando o contener polialilamina reticulada. Los ejemplos de los materiales de modo mixto incluyen resina Capto-Adhere, MEP HyperCel, HEA HyperCel o PPA HyperCel o membrana ChromaSorb. En algunos modos de realización, el material de modo mixto es la resina Capto-Adhere.

15 En algunos modos de realización se proporcionan en el presente documento procedimientos para purificar un anticuerpo a partir de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, en los que el procedimiento comprende (i) o (ii): (i) las etapas secuenciales de (a) cargar la composición en Poros HS50 a una densidad de carga superior a aproximadamente 150 g/l de resina y (b) cargar una composición recuperada de la Poros HS50 en Capto-Adhere; o (ii) las etapas secuenciales de (a) cargar la composición en Capto-Adhere y (b) cargar una composición recuperada de Capto-Adhere en Poros HS50 a una densidad de carga superior a
20 aproximadamente 150 g/l de resina.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga superior a aproximadamente cualquiera de 150 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l,
25 900 g/l o 1000 g/l de material de intercambio catiónico. La composición se puede cargar en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga de entre aproximadamente cualquiera de 150 g/l y 2000 g/l, 150 g/l y 1500 g/l, 150 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1500 g/l, 300 g/l y 1500 g/l, 400 g/l y 1000 g/l o 500 g/l y 1000 g/l de material de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, la composición se carga en un material de intercambio catiónico a una densidad de carga de aproximadamente cualquiera de 150 g/l, 300 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l,
30 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 850 g/l, 900 g/l, 1000 g/l, 1500 g/l o 2000 g/l de material de intercambio catiónico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga en un material de modo mixto con una densidad de carga superior a aproximadamente cualquiera de 25 g/l, 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l o 550 g/l de material de modo mixto. La composición se carga en un material de modo mixto a una densidad de carga de entre aproximadamente cualquiera de 25 g/l y 1000 g/l, 25 g/l y 700 g/l o 25 g/l y 500 g/l de material de modo mixto.
35

Se pueden emplear diversos tampones dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, de la conductividad deseada del tampón, de las características de la proteína de interés y del procedimiento de purificación. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden el uso de un tampón. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado o un tampón de lavado. En algunos modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son diferentes. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. El tampón puede comprender cloruro de sodio, acetato de sodio, o una mezcla de los mismos. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de acetato de sodio.
40
45

La carga, como se usa en el presente documento, es la composición cargada en un material de cromatografía. El tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición que comprende el polipéptido de interés en un material de cromatografía. El material de cromatografía se puede equilibrar con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar. El tampón de lavado se usa después de cargar la composición en un material de cromatografía para eluir el polipéptido de interés de la fase sólida.
50

La conductividad hace referencia a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medida básica para la conductividad es el siemens (o mho), mho (mS/cm), y se puede medir usando un medidor de conductividad, tal como diversos modelos de medidores de conductividad Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones de una solución para transportar corriente eléctrica, la conductividad de una solución se puede alterar cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tampón y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución se pueden alterar para conseguir la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada.
55
60
65

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la

- conductividad tiene una conductividad superior a aproximadamente cualquiera de 2 mS/cm, 5 mS/cm, 7,5 mS/cm o 10 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 2 mS/cm y 25 mS/cm, 2 mS/cm y 10 mS/cm, 3 mS/cm y 8 mS/cm, 2 mS/cm y 6 mS/cm, 4 mS/cm y 6 mS/cm o 2 mS/cm y 4 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad es de aproximadamente cualquiera de 2 mS/cm, 3 mS/cm, 4 mS/cm, 5 mS/cm, 6 mS/cm, 8 mS/cm o 10 mS/cm. En un aspecto, la conductividad es la conductividad del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, la conductividad de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y el tampón de lavado son las mismas. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de carga es diferente de la conductividad del tampón de lavado y/o del tampón de equilibrado.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón tiene un pH inferior a cualquiera de aproximadamente 10, 9, 8, 7 o 6. El tampón puede tener un pH entre cualquiera de aproximadamente 3 y 10, 4 y 8, 4 y 6 o 5 y 6. En algunos modos de realización, el pH es cualquiera de aproximadamente 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. El pH puede ser el pH del tampón de carga, el tampón de equilibrado o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es inferior a aproximadamente cualquiera de 50 CV/h, 40 CV/h o 30 CV/h. El caudal puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 5 CV/h y 50 CV/h, 10 CV/h y 40 CV/h o 18 CV/h y 36 CV/h. En algunos modos de realización, el caudal es de aproximadamente cualquiera de 9 CV/h, 18 CV/h, 25 CV/h, 30 CV/h, 36 CV/h o 40 CV/h. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es inferior a aproximadamente cualquiera de 100 cm/h, 75 cm/h o 50 cm/h. El caudal puede estar entre cualquiera de aproximadamente 25 cm/h y 150 cm/h, 25 cm/h y 100 cm/h, 50 cm/h y 100 cm/h o 65 cm/h y 85 cm/h. El caudal puede ser el caudal sobre el material de intercambio catiónico o el caudal sobre el material de modo mixto. En algunos modos de realización, el caudal sobre el material de intercambio catiónico es el mismo que el caudal sobre el material de modo mixto. En algunos modos de realización, el caudal sobre el material de intercambio catiónico es diferente del caudal sobre el material de modo mixto.
- La altura de lecho es la altura del material de cromatografía usado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la altura de lecho es superior a aproximadamente cualquiera de 3 cm, 10 cm o 15 cm. La altura de lecho puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 3 cm y 35 cm, 5 cm y 15 cm, 3 cm y 10 cm o 5 cm y 8 cm. En algunos modos de realización, la altura de lecho es de aproximadamente cualquiera de 3 cm, 5 cm, 10 cm o 15 cm. En algunos modos de realización, la altura de lecho del material de intercambio catiónico es la misma que la altura de lecho del material en modo mixto. En algunos modos de realización, la altura de lecho del material de intercambio catiónico es diferente de la altura de lecho del material de modo mixto.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el al menos un contaminante es uno cualquiera o más de CHOP, proteína A lixiviada, ADN, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina y contaminante vírico.
- Las CHOP son proteínas de células hospedadoras, *es decir*, proteínas de ovario de hámster chino. La cantidad de CHOP se puede medir mediante ensayo de inmunosorción ligado a enzima ("ELISA") o Meso Scale Discovery ("MSO"). En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de CHOP se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70%, 80 %, 90 % o 95 %. La cantidad de CHOP se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % u 85 % y 99 %.
- En algunos modos de realización, la cantidad de CHOP se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de CHOP en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de CHOP en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.
- El polipéptido agregado puede ser una proteína de alto peso molecular (HMW). En algunos modos de realización, el polipéptido agregado son multímeros del polipéptido de interés. El HMW puede ser un dímero, hasta un octámero o más, del polipéptido de interés. Los procedimientos de medición de la proteína agregada (por ejemplo, HMW) son conocidos en la técnica y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de proteína agregada se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. La cantidad de proteína agregada se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % u 85 % y 99 %. La cantidad de proteína agregada se puede reducir en aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de proteína agregada (por ejemplo, HMW) en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de proteína agregada (por ejemplo, HMW) en la composición antes de la etapa o etapas de

purificación.

La proteína A lixiviada es proteína A separada o lavada de una fase sólida a la que está unida. Por ejemplo, la proteína A lixiviada se puede lixiviar de una columna de cromatografía de afinidad por proteína A. La cantidad de proteína A se puede medir, por ejemplo, mediante ELISA. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de proteína A lixiviada se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de proteína A lixiviada se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % u 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de proteína A lixiviada se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de proteína A lixiviada en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de proteína A lixiviada en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

Los procedimientos de medición de ADN, tales como ADN de células de CHO, son conocidos en la técnica y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de ADN se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de ADN se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % u 85 % y 99 %. La cantidad de ADN se puede reducir en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de ADN en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de ADN en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

Componente de medio de cultivo celular hace referencia a un componente presente en un medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular puede ser un medio de cultivo celular en el momento de la recolección de células. En algunos modos de realización, el componente de medio de cultivo celular es gentamicina. La cantidad de gentamicina se puede medir mediante ELISA. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de componente de medio de cultivo celular se puede reducir entre aproximadamente cualquiera de 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, u 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos pueden comprender además una o más etapas de purificación antes o después de cualquiera de las etapas de cromatografía descritas en el presente documento. En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden además someter la composición que comprende el anticuerpo a una o más etapas de purificación adicionales antes o después de las etapas (a) y (b). Otros procedimientos de purificación incluyen, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita; cromatografía de filtración en gel; cromatografía de afinidad; electroforesis en gel; diálisis; precipitación con etanol; HPLC en fase reversa; cromatografía sobre sílice; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio y columnas quelantes metálicas para unirse a las formas marcadas con epítopo del anticuerpo.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además la recuperación del anticuerpo purificado. En algunos modos de realización, el anticuerpo purificado se recupera de cualquiera de las etapas de purificación descritas en el presente documento. La etapa de cromatografía puede ser cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de modo mixto o cromatografía de afinidad por proteína A.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además combinar el anticuerpo purificado de los procedimientos de purificación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

III. Polipéptidos

Se proporcionan polipéptidos para su uso en cualquiera de los procedimientos de purificación de polipéptidos y formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, el polipéptido es un polipéptido terapéutico. El polipéptido terapéutico puede inhibir el crecimiento de células tumorales, inducir la apoptosis y/o inducir la muerte celular. En algunos modos de

realización, el polipéptido es un antagonista. En algunos modos de realización, el polipéptido es un agonista. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un peso molecular superior a aproximadamente cualquiera de 5000 dalton, 10 000 dalton, 15 000 dalton, 25 000 dalton, 50 000 dalton, 75 000 dalton, 100 000 dalton, 125 000 dalton o 150 000 dalton. El polipéptido puede tener un peso molecular de entre aproximadamente cualquiera de 50 000 dalton a 200 000 dalton o 100 000 dalton a 200 000 dalton. Como alternativa, el polipéptido para uso en el presente documento puede tener un peso molecular de aproximadamente 120 000 dalton o aproximadamente 25 000 dalton.

El pl es el punto isoeléctrico y es el pH al cual una molécula o superficie particular no porta carga eléctrica neta. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el pl del polipéptido puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 6 a 10, 7 a 9 u 8 a 9. En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un pl de aproximadamente cualquiera de 6, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10.

Los polipéptidos a purificar usando los procedimientos descritos en el presente documento se producen generalmente utilizando técnicas recombinantes. Los procedimientos para producir proteínas recombinantes se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.534.615 y 4.816.567. En algunos modos de realización, la proteína de interés se produce en una célula de CHO (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11026). Cuando se usan técnicas recombinantes, los polipéptidos se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio.

Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Las células empleadas en la expresión de los polipéptidos se pueden romper por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes de lisis celular. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar polipéptidos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar por centrifugación. Cuando el polipéptido se secreta al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de polipéptidos disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales.

(A) Anticuerpos

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el polipéptido para su uso en cualquiera de los procedimientos de purificación de polipéptidos y formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento es un anticuerpo.

Los dianas moleculares para anticuerpos incluyen las proteínas CD y sus ligandos, tales como, pero sin limitación: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 α (CD79a) y CD79 β (CD79b); (ii) miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; (iii) moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina α 3, incluyendo las subunidades alfa o beta de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); (iv) factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, factor tisular 7, etc.; y (v) antígenos asociados a la superficie celular y a tumores transmembrana (TAA), tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

Otros anticuerpos ejemplares incluyen los seleccionados entre, y sin limitación, anticuerpo anti-receptor de estrógeno, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-HER-2/neu, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-cadherina E, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-glicoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti-proteína de retinoblastoma, anticuerpo anti-oncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo anti-ubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anti-citoqueratinas, anticuerpo anti-vimentinas, anticuerpo anti-proteínas HPV, anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa, anticuerpo anti-cadenas

ligeras lambda, anticuerpo anti-melanosomas, anticuerpo anti-antígeno específico de próstata, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti-antígeno tau, anticuerpo anti-fibrina, anticuerpo anti-queratinas y anticuerpo anti-antígeno Tn.

5 (i) Anticuerpos policlonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se crean preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con un polipéptido que sea inmunogénico en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa bocallave, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster sulfosuccinimida de maleimidobenzoilo (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg del polipéptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días más tarde, se toma sangre a los animales y se ensaya el título de anticuerpos en el suero. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. En algunos modos de realización, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con un polipéptido diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden elaborar en cultivo celular recombinante como fusiones polipeptídicas. También, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

(iii) Anticuerpos monoclonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden elaborar usando el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden elaborar por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe en el presente documento para desencadenar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, mantienen una producción de alto nivel estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. Se han descrito también líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

En el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. En algunos modos de realización, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un

ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, polipéptido A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfieren entonces en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen polipéptido de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188(1992).

En un modo de realización adicional, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas en fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature* 352:624 - 628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas en fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante intercambio de cadena (Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas en fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente la secuencia codificante de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina.

Típicamente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo, creando un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo es IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de IgG.

(iv) Anticuerpos humanizados

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. En algunos modos de realización, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como residuos de «importación», que típicamente se toman de un dominio variable de «importación». La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se han sustituido por residuos

de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la elaboración de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada. La misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, en algunos modos de realización de los procedimientos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y exhiben las estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas ilustraciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de receptor y de importación de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y lo más sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno.

(v) Anticuerpos humanos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.* 7:33 (1993) y las patentes de EE. UU. n.º 5.591.669; 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en fase en un gen de polipéptido de recubrimiento mayoritario o minoritario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se exhiben como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J* 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE. UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también se pueden generar por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. 5.567.610 y 5.229.275).

(vi) Fragmentos de anticuerpo

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas

técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas en fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En algunos modos de realización, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

(vii) Anticuerpos biespecíficos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes. Como alternativa, un brazo de unión de anticuerpo biespecífico se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. En algunos modos de realización, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En algunos modos de realización, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está 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 inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en modos de realización cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En algunos modos de realización 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 encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo

de células recombinantes. En algunos modos de realización, la interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

También se han descrito diversas técnicas para elaborar 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(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y se reoxidaron entonces para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6444 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar 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, se fuerza los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

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

(viii) Anticuerpos multivalentes

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferente comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de la región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento preferentemente comprende además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera.

El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

5

(ix) Otras modificaciones de anticuerpos

Puede ser deseable modificar el anticuerpo proporcionado en el presente documento con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se pueden introducir un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad mejorada de internalización y/o un aumento de la muerte celular mediada por complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B.J., *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo para tener regiones Fc duales y puede, por lo tanto, tener una capacidad potenciada de lisis mediada por complemento y de ADCC. Véase Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

10

15

20

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, se pueden hacer alteraciones de aminoácidos en el anticuerpo como se describe en el documento US 2006/0067930.

25

(B) Variantes y modificaciones de polipéptidos

La modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos, incluyendo anticuerpos, descritos en el presente documento se pueden utilizar en los procedimientos de purificación de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) descritos en el presente documento.

30

(i) Polipéptidos variantes

"Variante de polipéptido" significa un polipéptido, preferentemente un polipéptido activo como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia nativa de longitud completa del polipéptido, una secuencia polipeptídica que carece del péptido señal o un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Tales variantes de polipéptidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Normalmente, una variante de polipéptido TAT tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos cualquier identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con una secuencia polipeptídica de secuencia nativa de longitud completa, una secuencia polipeptídica que carece del péptido señal o un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Opcionalmente, los polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica nativa, como alternativa no más de aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica nativa.

35

40

45

El polipéptido variante puede estar truncado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con un polipéptido nativo de longitud completa. Ciertos polipéptidos variantes pueden carecer de residuos de aminoácidos que no sean esenciales para una actividad biológica deseada. Estos polipéptidos variantes con truncamientos, deleciones e inserciones se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los polipéptidos variantes deseados se pueden sintetizar químicamente. Otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante deseado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ácido nucleico se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los polipéptidos variantes comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido nativo divulgado en el presente documento.

50

55

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiloterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C-terminal del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

60

65

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las

variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) tales como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación.

Se pueden encontrar directrices para determinar qué residuo de aminoácido puede ser insertado, sustituido o suprimido sin afectar negativamente a la actividad deseada comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas polipeptídicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989). En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza un barrido de Ala o una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se realiza un cribado en las variantes de anticuerpo expresadas para la actividad deseada.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido de la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 1.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del polipéptido seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en forma de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, *Biochemistry*, segunda edición, pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

Como alternativa, los residuos de origen natural se pueden dividir en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al polipéptido para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución particularmente preferente implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Un modo conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se exhiben de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban entonces por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para su modificación, se puede realizar una mutagénesis de barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su diana. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del polipéptido altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. El polipéptido puede comprender restos no aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido puede estar glicosilado. Dicha glicosilación puede ocurrir naturalmente durante la expresión del polipéptido en la célula hospedadora o en el organismo hospedador, o puede ser una modificación deliberada que surja de la intervención humana. Por alteración se entiende suprimir uno o más restos de carbohidrato encontrados en el polipéptido y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido.

La glicosilación del polipéptido está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N hace referencia a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxisisina.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración se puede realizar también mediante la adición de o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina de la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

La retirada de los restos de carbohidrato presentes en el polipéptido se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de codones que codifican residuos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

(ii) Polipéptidos quiméricos

El polipéptido descrito en el presente documento se puede modificar de modo que forme moléculas quiméricas que comprenden el polipéptido fusionado con otro, polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En algunos

modos de realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El marcador del epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas marcadas con epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, la provisión del marcador de epítipo posibilita que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una al marcador de epítipo.

En un modo de realización alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Se hace referencia a una forma bivalente de la molécula quimérica como una "inmuno adhesina".

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de un polipéptido heterólogo con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana suprimido o inactivado) de un polipéptido en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un modo de realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de bisagra, CH₂ y CH₃, o bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1.

(iii) Conjugados polipeptídicos

El polipéptido para uso en formulaciones de polipéptidos se puede conjugar a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Se pueden usar agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales conjugados. Además, las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de polipéptidos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del polipéptido y del agente citotóxico se elaboran usando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos con el polipéptido.

Los conjugados de un polipéptido y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una calicheamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera del arbusto de África Oriental *Maytenus serrata*. Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol. También se contemplan el maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo. Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para elaborar conjugados polipéptido-maitansinoide incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 5.208.020. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterases, tal como se divulgan en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter.

El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace.

Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En un modo de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

Otro conjugado de interés comprende un polipéptido conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. Los antibióticos de la familia de las calicheamicinas son capaces de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicheamicina, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.712.374. Los análogos estructurales de la calicheamicina que se pueden usar incluyen, pero no sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 . Otro fármaco antitumoral que se puede conjugar con el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes antitumorales que se conjugan con los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288, así como esperamicinas.

En algunos modos de realización, el polipéptido puede ser un conjugado entre un polipéptido y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa, ADNasa).

En otro modo de realización más, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilizarse en la preorientación a tumor, en el que se administra el conjugado polipéptido-receptor al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y la administración entonces de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

En algunos modos de realización, el polipéptido se puede conjugar con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidílico) en un fármaco anticanceroso activo. El componente enzimático del inmunconjugado incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos en fármacos activos libres.

(iv) Otros

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende la unión del polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los polipéptidos se pueden atrapar también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's *Pharmaceutical Sciences* 18ª edición, Gennaro, A.R., Ed., (1990).

IV. Obtención de polipéptidos para uso en las formulaciones y procedimientos

Los polipéptidos usados en los procedimientos de purificación descritos en el presente documento se pueden obtener usando procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo los procedimientos de recombinación. Las siguientes secciones proporcionan directrices sobre estos procedimientos.

(A) Polinucleótidos

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, hacen referencia a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN.

5 Los polinucleótidos que codifican polipéptidos se pueden obtener a partir de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación, una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del polipéptido y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, los polinucleótidos que codifican el polipéptido se pueden obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

10 Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una cadena de molécula de inmunoglobulina entera, tal como una cadena ligera o una cadena pesada. Una cadena pesada completa incluye no sólo una región variable de cadena pesada (V_H) sino también una región constante de cadena pesada (C_H), que típicamente comprenderá tres dominios constantes C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} y una región "bisagra". En algunas situaciones, la presencia de una región constante es deseable.

15 Otros polipéptidos que pueden estar codificados por el polinucleótido incluyen fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno tales como anticuerpos de dominio único ("dAb"), Fv, scFv, Fab' y $F(ab')_2$ y "minicuerpos". Los minicuerpos son (típicamente) fragmentos de anticuerpos bivalentes en los cuales se ha extirpado el dominio C_{H1} y C_{K} o C_{L} . Como los minicuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales, deberían lograr una mejor penetración de tejido en el uso clínico/diagnóstico, aunque al ser bivalentes deberían retener mayor afinidad de unión que los fragmentos de anticuerpos monovalentes, tales como dAb. Por consiguiente, a menos que el contexto lo indique de otra manera, el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento abarca no sólo moléculas de anticuerpo entero sino también fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno del tipo discutido anteriormente. Preferentemente, cada región marco presente en el polipéptido codificado comprenderá al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a la estructura aceptora humana correspondiente. Así, por ejemplo, las regiones marco pueden comprender, en total, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos con respecto a las regiones marcoceptoras.

20 25 30 Convenientemente, los polinucleótidos descritos en el presente documento se pueden aislar y/o purificar. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos aislados.

35 El término "polinucleótido aislado" pretende indicar que la molécula se retira o se separa de su entorno normal o natural o se ha producido de tal manera que no está presente en su entorno normal o natural. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos purificados. El término purificado pretende indicar que se han retirado al menos algunas moléculas o sustancias contaminantes.

40 Convenientemente, los polinucleótidos están sustancialmente purificados, de tal manera que los polinucleótidos relevantes constituyen los polinucleótidos dominantes (es decir, más abundantes) presentes en una composición.

45 Los ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento. Por definición, tales ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos monocatenarios codificantes, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en dichos ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios de los mismos, o estos ácidos nucleicos complementarios (monocatenarios) en sí mismos.

50 La modificación o modificaciones también se pueden realizar fuera del dominio variable de la cadena pesada y/o del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo. Tal ácido nucleico mutante puede ser un mutante silencioso en el que uno o más nucleótidos se reemplazan por otros nucleótidos, en donde los nuevos codones codifican el mismo aminoácido o aminoácidos. Tal secuencia mutante puede ser una secuencia degenerada. Las secuencias degeneradas están degeneradas en lo que respecta al código genético, en el que un número ilimitado de nucleótidos son reemplazados por otros nucleótidos sin dar como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos originalmente codificada. Tales secuencias degeneradas pueden ser útiles debido a sus diferentes sitios de restricción y/o a la frecuencia de codones particulares que son preferentes para el hospedador específico, particularmente células de levadura, bacterianas o de mamífero, para obtener una expresión óptima del dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera.

55 60 Las secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia o secuencias de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en el presente documento o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido se denominan de aquí en adelante como "secuencia o secuencias homólogas"). En este caso, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. En este caso, el término "homología" se puede equiparar con "identidad".

65 En algunos modos de realización, la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de nucleótidos homólogas deben

codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o potencia la actividad del anticuerpo. En algunos modos de realización se toma la secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica en al menos aproximadamente cualquiera de un 75, 85, o 90 %, preferentemente idéntica en al menos aproximadamente un 95 o 98 %, a la secuencia en cuestión. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de aminoácidos en cuestión. No obstante, la homología también se puede considerar en términos de similitud (*es decir*, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares). En algunos modos de realización, es preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos aproximadamente cualquiera de un 75, 85 o 90 %, preferentemente idéntica en al menos aproximadamente un 95 o 98 %, a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito en el presente documento (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., que la secuencia en cuestión. No obstante, la homología también se puede considerar en términos de similitud (*es decir*, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares). En algunos modos de realización, es preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de módulo de una variante anterior preparada o una versión no variante del polipéptido.

(B) Expresión de polinucleótidos

La descripción que sigue se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene polinucleótidos que codifican polipéptidos. Se contempla, por supuesto, que se pueden emplear procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se puede producir por síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis* W.H. Freeman Co., San Francisco, California (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). Se puede realizar la síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, California) usando las instrucciones del fabricante. Diversos fragmentos del polipéptido se pueden sintetizar químicamente por separado y combinar usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido deseado.

Los polinucleótidos como se describen en el presente documento se insertan en un vector o vectores de expresión para la producción de los polipéptidos. El término "secuencias de control" hace referencia a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control incluyen, pero sin limitación, promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción.

Un polinucleótido se "une operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de polinucleótido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de una presecuencia o secuencia líder secretora se unen operativamente a ácidos nucleicos de un polipéptido si se expresan como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une operativamente a una secuencia codificante si se coloca de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, que son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante unión a sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Para anticuerpos, las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en el mismo o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ácido nucleico que codifican las cadenas de inmunoglobulina están unidos operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina.

Componente del gen de selección: Los vectores de expresión contienen, comúnmente, marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina, resistencia a kanamicina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, el documento US 4.704.362). En algunos modos de realización, los genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas o (c) suministran nutrientes

críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y que, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica anticuerpos descritos en el presente documento, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo natural que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un polipéptido descrito en el presente documento, una proteína DHFR de tipo natural y otro marcador seleccionable tal como la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics* 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se ha reseñado un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology* 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology* 9:968-975 (1991).

Componente de secuencia de señal: Los polipéptidos se pueden producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Una secuencia señal se puede sustituir por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilanasas, 1 pp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor α (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, están disponibles secuencias señal de mamíferos, así como secuencias líderes secretoras víricas, por ejemplo, la secuencia señal gD del herpes simple.

La secuencia de ácido nucleico para tal región precursora se une en el marco de lectura a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido descrito en el presente documento.

Origen de la replicación: Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia polinucleotídica que posibilita que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación, esta secuencia es aquella que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solamente porque contiene el promotor temprano).

Componente promotor: Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es

reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica el polipéptido. Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido.

Convenientemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, células COS –tales como células COS 7– o células de CHO). Una vez que el vector se ha incorporado al hospedador apropiado, se mantiene el hospedador en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recogida y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente entre 25 y 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre 70 y 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

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

La transcripción de los polipéptidos descritos en el presente documento a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como *adenovirus* 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, lo más preferentemente, virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón- β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous se puede usar como promotor.

Componente de elemento potenciador: La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido descrito en el presente documento por eucariotas superiores aumenta a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador/promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar al vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de la transcripción: Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones no traducidas 5' y,

ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc de eucariotas o virus. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

5 Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, las secuencias codificantes de cadena pesada variable y/o ligera variable y secuencias de control de la expresión opcionales) se pueden transferir a una célula hospedadora por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato cálcico, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus se pueden
10 usar para otros hospedadores celulares. (Véase generalmente Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2.^a ed., 1989). Otros procedimientos usados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar al genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células se pueden transferir a ovocitos enucleados.
15

Cuando las cadenas pesadas y ligeras se clonan en vectores de expresión separados, los vectores cotransfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina se pueden
20 purificar de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase generalmente Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, (1982)). Son preferentes inmunoglobulinas sustancialmente puras con al menos aproximadamente un 90 a 95 % de homogeneidad y lo más preferente es una homogeneidad de aproximadamente un 98 a 99 % o más para usos farmacéuticos.
25

(C) Constructos

Típicamente, el constructo será un vector de expresión que permite la expresión, en un hospedador adecuado, del polipéptido o polipéptidos codificados por el polinucleótido. El constructo puede comprender, por ejemplo, uno o
30 más de los siguientes: un promotor activo en el hospedador; una o más secuencias reguladoras, tales como potenciadoras; un origen de replicación y un marcador, preferentemente un marcador seleccionable. El hospedador puede ser un hospedador eucariota o procariota, aunque pueden ser preferentes hospedadores eucariotas (y especialmente mamíferos). La selección de promotores adecuados dependerá obviamente en cierta medida de la célula hospedadora usada, pero puede incluir promotores de virus humanos tales como HSV, SV40, RSV y similares. Numerosos promotores son conocidos por los expertos en la técnica.
35

El constructo puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende tres bucles hipervariables de cadena ligera o tres bucles hipervariables de cadena pesada. Como alternativa, el polinucleótido puede codificar un polipéptido que comprende tres bucles hipervariables de cadena pesada y tres bucles hipervariables de cadena ligera unidos por un enlazador adecuadamente flexible de longitud apropiada. Otra
40 posibilidad es que un constructo único puede comprender un polinucleótido que codifica dos polipéptidos separados, uno que comprende los bucles de cadena ligera y otro que comprende los bucles de cadena pesada. Los polipéptidos separados se pueden expresar independientemente o pueden formar parte de un único operón común.
45

El constructo puede comprender uno o más rasgos reguladores, tales como un potenciador, un origen de replicación y uno o más marcadores (seleccionables o no). El constructo puede tomar la forma de un plásmido, un cromosoma artificial de levadura, un minicromosoma de levadura o integrarse en todo o parte del genoma de un virus, especialmente un virus atenuado o similar que no sea patógeno para humanos.
50

El constructo se puede formular convenientemente para su administración segura a un sujeto mamífero, preferentemente humano. Típicamente, se proporcionarán en una pluralidad de alícuotas, conteniendo cada alícuota constructo suficiente para la inmunización eficaz de al menos un sujeto humano adulto normal.
55

El constructo se puede proporcionar en forma líquida o sólida, preferentemente como un polvo liofilizado que, típicamente, se rehidrata con un líquido acuoso estéril antes de su uso.

El constructo se puede formular con un adyuvante u otro componente que tenga el efecto de aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto (por ejemplo, medida por el título de anticuerpo específico) en respuesta a la administración del constructo.
60

(D) Vectores

El término "vector" incluye vectores de expresión y vectores de transformación y vectores lanzadera.
65

El término "vector de expresión" significa un constructo con capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro*.

El término "vector de transformación" significa un constructo capaz de transferirse de una entidad a otra entidad, que puede ser de esa especie o puede ser de una especie diferente. Si el constructo es capaz de transferirse de una especie a otra, tal como de un plásmido de *Escherichia coli* a una bacteria, tal como del género *Bacillus*, entonces el vector de transformación se denomina a veces un "vector lanzadera". Puede incluso ser un constructo capaz de transferirse de un plásmido de *E. coli* a un *Agrobacterium* a una planta.

Los vectores se pueden transformar en una célula hospedadora adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido. Diversos vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de unión estándar que son conocidas por el experto en la técnica.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos, virus o fagos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables que son bien conocidos en la técnica.

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos hospedadores, bien como episomas o bien como parte integral del ADN cromosómico del hospedador.

(E) Células hospedadoras

La célula hospedadora puede ser una bacteria, una levadura u otra célula fúngica, célula de insecto, una célula de planta, o una célula de mamífero, por ejemplo.

Se puede usar un organismo hospedador multicelular transgénico que se ha manipulado genéticamente para producir un polipéptido. El organismo puede ser, por ejemplo, un organismo transgénico de mamífero (por ejemplo, una línea transgénica de cabra o de ratón).

Los procariontes adecuados incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariontes adecuadas 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 bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador principal particularmente preferente porque es una cepa hospedadora común para fermentaciones de producto de polinucleótido recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican polipéptidos endógenos para el hospedador, incluyendo los ejemplos de tales hospedadores *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo lon A; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55, 244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompTkan; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección degP no resistente a kanamicina y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante. Como alternativa, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

En estos hospedadores procariontes se pueden elaborar vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estarán presentes cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor a partir de fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Los microbios eucariotas se pueden usar para la expresión. Los microbios eucariotas tales como hongos o levaduras filamentosos son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*

tales como *Schwanniomyces occidentalis* y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedadores *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, levaduras capaces de crecer sobre metanol seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* es un hospedador de levadura preferente, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, el cultivo de células de tejido de mamífero también se puede usar para expresar y producir los polipéptidos como se describe en el presente documento y, en algunos casos, es preferente (véase Winnacker, *From Genes to Clones* VCH Publishers, NY, NY (1987)). Para algunos modos de realización, las células eucariotas pueden ser preferentes, porque se han desarrollado en la técnica una serie de líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar polipéptidos heterólogos (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas), e incluyen líneas celulares de CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferentemente, líneas celulares de mieloma o linfocitos B transformados o hibridomas. En algunos modos de realización, la célula hospedadora de mamífero es una célula de CHO.

En algunos modos de realización, la célula hospedadora es una célula hospedadora de vertebrado. Son ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión; células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (línea CHO o CHO-DP-12); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI; células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Como alternativa, las secuencias codificantes de polipéptidos se pueden incorporar a transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico. Los transgenes adecuados incluyen secuencias de codificación de cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta-lactoglobulina.

Como alternativa, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden producir en plantas transgénicas (por ejemplo, tabaco, maíz, soja y alfalfa). Los vectores de 'planticuerpo' mejorados (Hendy *et al.*, *J. Immunol. Methods* 231:137-146 (1999)) y las estrategias de purificación combinadas con un aumento en las especies de cultivos transformables hacen que estos procedimientos sean un medio práctico y eficaz de producir inmunoglobulinas recombinantes no sólo para terapia humana y animal, sino también para aplicaciones industriales (por ejemplo, anticuerpos catalíticos). Además, se ha demostrado que los anticuerpos producidos en plantas son seguros y eficaces y evitan el uso de materiales derivados de animales. Además, las diferencias en los patrones de glicosilación de anticuerpos producidos en células de plantas y mamíferos tienen poco o ningún efecto sobre la unión a o la especificidad de antígeno. Además, no se han observado evidencias de toxicidad o HAMA en pacientes que recibieron la aplicación oral tópica de un anticuerpo IgA dimérico secretor derivado de planta (véase Larrick *et al.*, *Res. Immunol.* 149:603-608 (1998)).

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, se pueden seleccionar por el experto en la técnica sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach* M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se efectúa usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento del calcio que emplea cloruro de calcio o electroporación se usa generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, como se describe por Shaw *et al.*, *Gene* 23:315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology* 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas hospedadores de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente de acuerdo con el procedimiento 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 se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policonaciones, por ejemplo polibreno o poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véanse Keown *et al.*, *Methods in Enzymology* 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature* 336:348-352 (1988).

Los polipéptidos, por ejemplo anticuerpos, se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocombinado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de polipéptidos en bacterias véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.840.523, que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células de CHO.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos glicosilados descritos en el presente documento derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células hospedadoras permisivas de insectos de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden usar como el virus del presente documento, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Las células hospedadoras usadas para producir el polipéptido se pueden cultivar en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede incluir también en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

V. Formulaciones y procedimientos de elaboración de las formulaciones

En el presente documento también se proporcionan formulaciones y procedimientos para elaborar la formulación que comprende los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) purificada por los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido purificado se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones polipeptídicas en algunos modos de realización se pueden preparar para almacenamiento mezclando un polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los "vehículos" como se usan en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado.

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 y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™,

PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En algunos modos de realización, el polipéptido de la formulación de polipéptido mantiene la actividad funcional.

- 5 Las formulaciones que se vayan a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

10 Las formulaciones en el presente documento pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no resultan afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un polipéptido, puede ser deseable incluir en la formulación un polipéptido adicional (por ejemplo, un anticuerpo). Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citocina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido.

15 **V. Artículos de fabricación**

20 Los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento y/o las formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento pueden estar contenidos en un artículo de fabricación. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente que contiene el polipéptido y/o la formulación de polipéptido. Preferentemente, el artículo de fabricación comprende: (a) un recipiente que comprende una composición que comprende el polipéptido y/o la formulación de polipéptido descrita en el presente documento dentro del recipiente y (b) un prospecto con instrucciones para administrar la formulación a un sujeto.

25 El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden obtener en una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente retiene o contiene una formulación y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es el polipéptido. La etiqueta o prospecto indica el uso de la composición en un sujeto con unas directrices específicas con respecto a las cantidades e intervalos de dosificación del polipéptido y de cualquier otro fármaco que se proporcione. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. En algunos modos de realización, el recipiente es una jeringa. En algunos modos de realización, la jeringa está además contenida dentro de un dispositivo de inyección. En algunos modos de realización, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

30 El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas normalmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos para combinar con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

35 Se ilustran detalles adicionales de la invención en los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **Ejemplos**

Los ejemplos a continuación están destinados a ser puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no se debe considerar que limiten la invención de ninguna manera. Los siguientes ejemplos y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1 – Selección de materiales de intercambio catiónico sobrecargados

55 Este ejemplo describe un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humanizado recombinante, un anticuerpo anti-CD11a humanizado recombinante y un anticuerpo anti-CD20 quimérico recombinante. Las estructuras del anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20 se han divulgado en las patentes de EE.UU. n.º 7.169.901, 6.703.018 y 5.736.137, respectivamente.

60 **Materiales y procedimientos**

Procedimientos de purificación

65 El fluido de cultivo celular que contenía el anticuerpo monoclonal producido en células de ovario de hámster chino se procesó mediante centrifugación continua para retirar los desechos celulares y se clarificó adicionalmente mediante filtración con filtros de profundidad y filtro de 0,2 µm. Los fluidos de cultivo de células recolectadas se

purificaron mediante cromatografía de afinidad por proteína A. Las condiciones de carga y de lavado estaban a un intervalo de pH neutro y la elución se llevó a cabo a un intervalo de pH bajo durante la cromatografía. El pH y la conductividad de los conjuntos de proteínas obtenidos de la columna de proteína A se ajustaron a las condiciones de carga usadas para la cromatografía de intercambio catiónico y entonces se filtraron a 0,22 µm. Se usaron el mismo pH y la misma conductividad para las condiciones de carga de cromatografía de intercambio catiónico, las condiciones de equilibrado y las condiciones de lavado iniciales. Los conjuntos de proteínas filtradas y equilibradas se usaron como producto para la cromatografía de intercambio catiónico posterior. La concentración de producto (g/l) se determinó por absorbancia a 280 nm. Se utilizaron las condiciones de cromatografía de intercambio catiónico específicas como se indica en la sección *Procedimientos experimentales y resultados* a continuación.

Ensayos

Los ensayos para todos los ejemplos se efectuaron como se indica a continuación.

Ensayo de concentración de anticuerpos

La concentración de anticuerpos en el fluido de cultivo de células recolectadas (HCCF) se determinó usando un ensayo de HPLC de proteína A de Poros (Applied Biosystems, Foster City, CA). La columna se utilizó a un caudal de 2,0 ml/min, equilibrada en tampón de fosfato de sodio/cloruro de sodio a pH 6,3 y se eluyó con ácido acético / solución de glicina a pH 2,5. Se monitorizó la absorbancia a 280 nm y el área del pico de elución se usó para cuantificar la concentración de anticuerpo a partir de una curva patrón. El anticuerpo presente en los conjuntos purificados obtenidos mediante cromatografía de afinidad por proteína A o intercambio iónico se determinó por la absorbancia a 280 nm (restando la absorbancia a 320 nm para corregir la dispersión de la luz), usando un espectrofotómetro con una celda de flujo de 10 mm de longitud de trayectoria. La concentración de anticuerpo se calculó como [(absorbancia a 280 nm – absorbancia a 320 nm) x dilución]/coeficiente de extinción.

Ensayo de CHOP

Se usaron dos ensayos de CHOP, el ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA) y ensayos Meso Scale Discovery (MSD).

Ensayo ELISA de CHOP: Muestras de tandas cromatográficas seleccionadas se remitieron a un grupo de ensayo que efectuó un ELISA estándar y validado para cuantificar los niveles de CHOP. Se inmovilizaron anticuerpos anti-CHOP de cabra purificados por afinidad sobre pocillos de placas de microvaloración. Las diluciones de las muestras que contenían CHOP, patrones y controles se incubaron en los pocillos, seguido de incubación con anticuerpos anti-CHOP de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se detectó con diclorhidrato de o-fenilendiamina. Se cuantificó la CHOP mediante lectura de absorbancia a 492 nm en un lector de placas de microvaloración. Se usó un programa informático de ajuste de curvas para generar la curva patrón y calcular automáticamente la concentración de la muestra. El intervalo de ensayo para el ELISA era típicamente de 5 ng/ml a 320 ng/ml, y los resultados se estandarizaron a ppm para comparaciones de conjuntos.

Ensayo MSD de CHOP: Muestras de tandas cromatográficas seleccionadas se remitieron a un grupo de ensayo que efectuó un ensayo estándar y validado de MSD para cuantificar los niveles de CHOP. Se inmovilizaron anticuerpos anti-CHOP de cabra purificados por afinidad sobre pocillos de placas de microvaloración. Las diluciones de las muestras que contenían CHOP, patrones y controles se incubaron en los pocillos, seguido de incubación con anticuerpos anti-CHOP de cabra conjugados con éster de NHS con marcador sulfo de MSD. El éster de NHS tiene un enlazador amino-reactivo, un éster de N-hidroxisuccinimida, que se acopla fácilmente a grupos amina primaria de proteínas. La concentración de CHOP se midió después de la adición del tampón de lectura de MSD y la aplicación de electricidad a la parte inferior de la placa. Los anticuerpos de detección marcados interaccionaron con el tampón de lectura que contenía tripropilamina emitiendo luz tras la estimulación electroquímica iniciada en las superficies de electrodo de microplacas Multi-Array a 620 nm, y se midió mediante una cámara CCD. La concentración se obtuvo entonces por regresión inversa en la curva patrón. El intervalo de ensayo para el ensayo era de 5 ng/ml a 1530 ng/ml, y los resultados se estandarizaron a ppm para la comparación de conjuntos.

Ensayo de proteína A

Se detectó proteína A lixiviada en muestras donde se ha utilizado la cromatografía de afinidad por proteína A para el procedimiento de recuperación. El nivel de proteína A se determinó mediante un ELISA en sándwich de proteína A. Se inmovilizaron anticuerpos anti-proteína A estafilocócica de pollo sobre pocillos de placas de microvaloración. El procedimiento de tratamiento de la muestra incluía la dilución de la muestra y la disociación entonces del complejo proteína A/IgG usando calentamiento asistido por microondas como una etapa de pretratamiento antes de someter las muestras a un ELISA de sándwich. La proteína A, si está presente en la muestra, se unió el anticuerpo de recubrimiento. La proteína A unida se detectó con anticuerpos anti-proteína conjugados con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se cuantificó con una

solución de sustrato TMB de 2 componentes que produce una señal colorimétrica.

Ensayo de gentamicina

5 Se utilizó un ELISA competitivo para determinar las concentraciones de gentamicina en todos los conjuntos. Se
 10 Se inmovilizaron anticuerpos policlonales de cabra contra gentamicina-BSA sobre pocillos de placa de
 microvaloración. La gentamicina competía con la gentamicina biotinilada por la unión a los anticuerpos. La cantidad
 de gentamicina marcada con biotina unida se detectó con la adición de peroxidasa de rábano picante-
 estreptavidina y sustrato de o-fenilendiamina. Las muestras se diluyeron en serie en el diluyente de ensayo de
 manera que la lectura de absorbancia entrara dentro del intervalo cuantificable del ensayo (0,37-90 ng/ml).

Cromatografía de exclusión por tamaño

15 La heterogeneidad de tamaño de los anticuerpos monoclonales se determinó mediante un ensayo de cromatografía
 de exclusión por tamaño de alto rendimiento. Se empleó una columna TSK-GEL G3000SWXL (7,8 mm x 300 mm,
 Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) para separar especies monoméricas y de peso molecular más alto
 (HMW). La columna se utilizó a un caudal de 0,3 ml/min usando una fase móvil de fosfato de potasio 200 mM,
 cloruro de potasio 250 mM y pH 6,2. Se inyectaron 20 µg de anticuerpo para cada muestra. Se usó la absorbancia
 a 280 nm para monitorizar la separación del monómero y los HMW. Los porcentajes de monómeros y HMW se
 20 calcularon en base a sus áreas de pico.

Ensayo de ADN

25 La PCR de Taqman para el ensayo de ADN de células de CHO usa PCR en tiempo real para detectar y cuantificar
 el ADN de CHO en muestras de producto. En primer lugar se extraen el ADN de las muestras y los controles
 usando el kit Virus Biorobot de Qiagen. Las muestras extraídas, los controles y el ADN estándar se someten a la
 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de TaqMan en tiempo real usando cebadores de PCR y sonda en una
 placa de 96 pocillos con el sistema de detección de secuencias de ABI. Los cebadores se definen por un segmento
 30 con un tinte indicador fluorescente en el extremo 5' y un tinte neutralizador en el extremo 3'. Cuando la sonda está
 intacta, el espectro de emisión del indicador es suprimido por el neutralizador. La actividad 5' nucleasa de la
 polimerasa hidroliza la sonda y libera el indicador, lo que da como resultado un aumento de la emisión de
 fluorescencia. El detector de secuencia cuantifica el producto amplificado en proporción directa al aumento de la
 emisión de fluorescencia medida continuamente durante la amplificación del ADN. Los números de ciclos en los
 35 que el ADN se ha amplificado más allá del umbral (CT) se calculan para la curva patrón. Se genera una curva
 patrón en el intervalo de 1 pg/ml–10.000 pg/ml, que se usa para cuantificar el ADN en las muestras.

Procedimientos experimentales y resultados

40 Purificación de anticuerpo anti-CD11a

En este estudio se evaluaron tres tipos de materiales de intercambio catiónico: resina, membrana y monolito. Los
 procedimientos de purificación por intercambio catiónico sobrecargado del anticuerpo anti-CD11a usando estos
 tres materiales de intercambio catiónico se evaluaron con respecto al rendimiento del procedimiento (por ejemplo,
 45 retirada de impurezas, rendimiento de etapas y calidad del producto).

Los cromatogramas de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (0,66 cm
 de diámetro interior ("D.I.") x 5 cm, 15,1 CV/h) y columna SP Sepharose FF ("SPFFF") (0,66 cm D.I. x 4,8 cm,
 15,7 CV/h)), monolito (SO3 Monolith (0,34 ml, 353 MV/h)) y membrana (Mustang S (0,18 ml, 333 MV/h)), cargado
 50 con el producto hasta 1000 g/l de CV (volumen de columna) o MV (volumen de membrana o monolito), se
 obtuvieron a pH 5,5 y 3 mS/cm. Véase la Figura 1.

El rendimiento de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (15,1 CV/h o
 75 cm/h) y columna SPSFF (15,7 CV/h o 75 cm/h)), membrana (Mustang S (333 MV/h)), y monolito (SO3 Monolith
 55 (353 MV/h)) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV o de MV se evaluó a pH 5,5 y
 3 mS/cm. Como se muestra en la Figura 2, se consiguió una recuperación de anticuerpo anti-CD11a monomérico
 de más del 93 % para Mustang S, Monolith SO3 y Poros HS50 y de aproximadamente el 88 % de recuperación de
 anticuerpo anti-CD11a monomérico para SPSFF.

60 La capacidad de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (15,1 CV/h o
 75 cm/h) y columna SPSFF (15,7 CV/h o 75 cm/h)), membrana (Mustang S (333 MV/h)), y monolito (SO3 Monolith
 (353 MV/h)) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV o de MV se evaluó para retirar
 CHOP a pH 5,5 y 3 mS/cm. Como se muestra en la Figura 2, el material monolítico, SO3 Monolith, era mejor en la
 retirada de CHOP que los otros dos materiales de intercambio catiónico. La membrana (Mustang S) y la columna
 65 Poros HS50 eran similares y mejores que la columna SPSFF en la retirada de CHOP. Véase la Figura 2.

La capacidad de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (15,1 CV/h o 75 cm/h) y columna SPSFF (15,7 CV/h o 75 cm/h)), membrana (Mustang S (333 MV/h)), y monolito (SO3 Monolith (353 MV/h)) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV o de MV se evaluó para retirar HMW a pH 5,5 y 3 mS/cm. Como se muestra en la Figura 3, el material de intercambio catiónico de resina, Poros HS50, era el más eficaz en la retirada de HMW, seguido de SPSFF. Además, Mustang S era mejor que SO3 Monolith en la retirada de HMW. Véase la Figura 3.

La capacidad de los materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 y columna SPSFF), membrana (Mustang S) y monolito (SO3 Monolith) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV o de MV para retirar HMW1 y HMW2 también se evaluó a pH 5,5 y 3 mS/cm. Como se muestra en la Figura 4, Poros HS50 y Mustang S eran más eficaces en la retirada de HMW2.

Se examinó la capacidad de Poros HS50 (15,1 CV/h o 75 cm/h) para retirar HMW1 y HMW2 con el producto cargado en una cantidad variable de hasta 1000 mg/ml de CV a pH 5,5 y 3 mS/cm. La HMW era de 6,26 % y 60 % en la carga y en el conjunto de elución, respectivamente. Como se muestra en la Figura 5, Poros HS50 era eficaz en la retirada tanto de HMW1 como de HMW2.

La capacidad de SPSFF de retirar HMW con el producto cargado en cantidad variable de producto de hasta aproximadamente 800 g/l de CV se evaluó a pH 5,5 y 3 mS/cm. La Figura 6 muestra los cromatogramas y la retirada de HMW.

En la Tabla 2 se resumió el rendimiento de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 y columna SPSFF), membrana (Mustang S) y monolito (SO3 Monolith). El procedimiento comercial para purificar anti-CD11a usaba el modo de unión-elución y una densidad de carga de 15-44 mg/ml de CV. Como se muestra en la Tabla 2, SO3 Monolith era el más eficaz en la retirada de CHOP y la resina Poros HS era la más eficaz en la retirada de HMW. El procedimiento de Poros HS sobrecargado era similar en las retiradas de HMW y CHOP al procedimiento de SPSFF comercial. Véase la Tabla 2.

Tabla 2.

	En carga (g/l)	En el conjunto de CEX				
		Procedimiento de SPSFF comercial	Poros HS	SPSFF	Mustang S	SO ₃ Monolith
CHOP ppm	600-900 en el procedimiento comercial; 600 en el presente estudio	72-183	<150	<400	<150	<60
HMW %	~5 en el procedimiento comercial; 6,2 en el presente estudio	0,2	0,4 500 g/l de CV recogido	1 500 g/l de CV recogido	2,7 500 g/l de MV recogido	4,7 500 g/l de MV recogido

Purificación del anticuerpo anti-VEGF

En este estudio se evaluaron tres tipos de materiales de intercambio catiónico: resina, membrana y monolito. Los procedimientos de purificación por intercambio catiónico sobrecargado del anticuerpo anti-VEGF usando estos tres materiales de intercambio catiónico se evaluaron con respecto al rendimiento del procedimiento (por ejemplo, retirada de impurezas, rendimiento de etapas y calidad del producto).

Los cromatogramas de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (0,66 cm D.I. x 5,4 cm, 18,5 CV/h) y columna SPSFF (0,66 cm D.I. x 5,5 cm, 18,5 CV/h)), monolito (SO3 Monolith (0,34 ml, 176 MV/h)) y membrana (Mustang S (0,35 ml, 171 MV/h)), cargado con el producto hasta cerca de 1000 g/l de CV o de MV, se obtuvieron a pH 5,5 y 5 mS/cm. Véase la Figura 7.

El rendimiento de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (1,8 ml) y columna SPSFF (1,8 ml)), membrana (Mustang S (0,35 ml)) y monolito (SO3 Monolith (0,34 ml)) con una cantidad variable del producto cargado de entre 0 y 1000 g/l de CV o MV se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm. Para la cromatografía de membrana y monolítica, el caudal usado era de 100-400 MV/h. Para las resinas, el caudal usado estaba entre 50-200 cm/h (9-36 CV/h). Se consiguió una recuperación del anticuerpo anti-VEGF monomérico superior al 90 % usando todos los materiales de intercambio catiónico, como se muestra en la Figura 8.

La capacidad de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (18 CV/h y 1,7 ml) y columna SPSFF (18 CV/h y 1,7 ml)), membrana (Mustang S (171 MV/h) y Sartobind S (120 MV/h)) y

monolito (SO3 Monolith (176 MV/h)), con una cantidad variable del producto cargado de entre 0 y 1000 g/l de CV o de MV para retirar CHOP se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm. Como se muestra en la Figura 9, el monolito, SO3 Monolith, era mejor en la retirada de CHOP que los otros dos materiales de intercambio catiónico. Los materiales de intercambio catiónico de resina (columna Poros HS50 y columna SPSFF) y las membranas (Mustang S y Sartobind S) eran similares en la retirada de CHOP. Véase la Figura 9.

La capacidad de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (18 CV/h) y columna SPSFF (18 CV/h)), membrana (Mustang S (171 CV/h)) y monolito (SO3 Monolith (176 CV/h)), con una cantidad variable del producto cargado de entre 0 y 1000 g/l de CV o de MV para retirar el ADN se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm. El material de intercambio catiónico de resina Poros HS50 era el más eficaz en la retirada del ADN. Véase la Figura 10.

La capacidad de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (18 CV/h), columna Poros HS50 (18 CV/h) con anticuerpo monomérico ("AcM") diluido 1:2 y columna SPSFF (18 CV/h)), membrana (Mustang S (176 MV/h) y Sartobind S (120 MV/h)) y monolito (SO3 Monolith (171 MV/h)) con cantidades variables del producto cargadas de entre 0 y 1000 g/l de CV o MV para retirar HMW se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm. Como se muestra en la Figura 11, el material de intercambio catiónico de resina, Poros HS50, era el más eficaz en la retirada de HMW seguido de SPSFF. Además, Mustang S era mejor que SO3 Monolith en la retirada de HMW. Véase la Figura 11.

La capacidad de los materiales de intercambio catiónico, resina (columna Poros HS50 (18 CV/h), columna Poros HS50 (18 CV/h) con AcM diluido y columna SPSFF (18 CV/h)), membrana (Mustang S (176 MV/h)) y monolito (SO3 Monolith (171 MV/h)) con cantidades variables del producto cargadas de entre 0 y 1000 g/l de CV o de MV para retirar HMW1 y HMW2 también se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm. Como se muestra en la Figura 12, la retirada de HMW2 era generalmente más eficaz que la retirada de HMW1. Véase la Figura 12.

La capacidad de unión dinámica ("DBC") de los tres tipos de materiales de intercambio catiónico, resina (columna de SPSFF (1,88 ml) y columna Poros HS50 (1,85 ml)), membrana (Mustang S coin (0,35 ml) y Mustang S Acrodisc (0,18 ml)) y monolito (disco SO3 Monolith (1 disco de 0,34 ml) y disco SO3 Monolith (2 discos de 0,68 ml)) se evaluó a pH 5,5 y 5 mS/cm usando múltiples caudales. Como se describe y se muestra en la Tabla 3, la resina de intercambio catiónico tenía mejores capacidades de unión a AcM que la membrana y el monolito. En general, la capacidad de unión a AcM de los materiales de intercambio catiónico se correlacionaba con su capacidad para retirar HMW. Véanse la Figura 11 y la Tabla 3. Poros HS50 mostró un mejor transporte de masa que SPSFF. Véase la Tabla 3. Poros HS50 mostró una DBC más alta que Mustang S y Monolith SO3. Véase la Tabla 3.

Tabla 3.

Caudal	DBC al 5 % de BT	
<i>SPSFF (0,66 cm D.I. x 5,5 cm = 1,88 ml)</i>		
9,1 CV/h	50 cm/h	67,2
18,2 CV/h	100 cm/h	52,6
36,4 CV/h	200 cm/h	41,0
54,5 CV/h	300 cm/h	30,7
<i>Poros 50HS (0,66 cm D.I. x 5,4 cm = 1,85 ml)</i>		
9,3 CV/h	50 cm/h	55,7
18,5 CV/h	100 cm/h	51,4
37 CV/h	200 cm/h	47,4
55,6 CV/h	300 cm/h	44,3
<i>Mustang S coin 0,35 ml</i>		
171,4 CV/h	1 ml/min	21,9
<i>Mustang S (Acrodisc) 0,18 ml</i>		
171,4 CV/h	1 ml/min	20,6
<i>Disco Monolith SO3 (0,34 ml-1 disco)</i>		
88,2 CV/h	0,5 ml/min	17,5
176,5 CV/h	1 ml/min	17,8
<i>Disco Monolith SO3 (0,68 ml-2 discos)</i>		
88,2 CV/h	1 ml/min	17,6

Purificación de anticuerpo anti-CD20

La capacidad de diversos tipos de resina de intercambio catiónico (Poros HS50, SE HiCap, SPSFF, SPXL y Capto S) para retirar HMW se evaluó usando placas de 96 pocillos de alto rendimiento y modo de unión por lotes con el producto cargado a 70–90 mg/ml de resina a diversos pH y concentraciones salinas para la purificación de un anticuerpo anti-CD20. La retirada de HMW se evaluó mediante el % de HMW unido a la resina. Como se muestra en la Figura 13, Poros HS50 era la más eficaz en la retirada de HMW, seguida de SE HiCap. Además, SPSFF era mejor que SPXL en la retirada de HMW. Véase la Figura 13. Además, SPXL era similar a Capto S en la retirada

de HMW. Véase la Figura 13.

La capacidad de diversos tipos de resina (Poros HS50, SE HiCap, SPSFF, SPXL y Capto S) para retirar CHOP se evaluó usando placas de 96 pocillos de alto rendimiento con el producto cargado a 70-90 mg/ml de resina a diversos pH y concentraciones salinas. La retirada de CHOP se evaluó mediante el % de CHOP unido a la resina. Como se muestra en la Figura 14, Poros HS50 era la más eficaz en la retirada de CHOP, seguida de SE HiCap. Además, SPSFF era mejor que SPXL en la retirada de CHOP. Véase la Figura 14. Además, SPXL era mejor que Capto S en la retirada de CHOP. Véase la Figura 14.

Se examinó adicionalmente la capacidad de las resinas Poros HS50 y Capto S para retirar HMW usando cromatografía en columna con una cantidad variable del producto cargado a 5 mS/cm y diferentes pH (Poros HS50 a pH 5,5 y pH 6 y Capto S a pH 5 y pH 5,5). Como se muestra en la Figura 15, Poros HS50 era mejor que Capto S en la unión a HMW. El porcentaje de HMW acumulado era menor en los conjuntos de productos recogidos de las tandas cromatográficas en resina Poros HS50 que en los conjuntos de productos recogidos de las tandas en la resina Capto S. Véase la Figura 16.

Se examinó también la capacidad de las resinas Poros HS50 y Capto S para retirar CHOP usando cromatografía en columna con una cantidad variable del producto cargado a 5 mS/cm y diferentes pH (Poros HS50 a pH 5,5 y pH 6 y Capto S a pH 5 y pH 5,5). Como se muestra en la Figura 17, Poros HS50 era mejor que Capto S en la unión a CHOP. La CHOP acumulada era menor en los conjuntos de productos recogidos de las tandas cromatográficas en resina Poros HS50 que en los conjuntos de productos recogidos de las tandas en resina Capto S. Véase la Figura 18.

Ejemplo 2 - Cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado usando diversas condiciones de purificación

Este ejemplo describe un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado para purificar anticuerpos.

Materiales y procedimientos

Procedimientos de purificación

Los conjuntos de proteínas filtradas y equilibradas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se usaron como producto para la cromatografía de intercambio catiónico.

Las columnas se empaquetaron con resina Poros HS50 o SPSFF o Capto S, respectivamente. Las dimensiones de la columna eran de 0,66 cm D.I. x 5 a 15 cm de altura de lecho. Los caudales usados eran de 50-200 cm por hora (9-36 volúmenes de columna (CV) por hora). La cromatografía se monitorizó a 280 nm y se efectuó a temperatura ambiente.

Para evitar la exclusión del anticuerpo de la resina de cromatografía, por ejemplo, la conductividad de carga optimizada a la cual se puede obtener la capacidad de unión dinámica máxima es 4-6 mS/cm a pH 5-6. En el primer estudio de grupo se usaron la conductividad de 5-6 mS/cm y el pH de 5,0-5,5 en la condición de carga en las columnas de intercambio catiónico.

El producto determinado a 280 nm se cargó hasta 1000 g/l de volumen de columna durante cada tanda cromatográfica. Se aplicó una etapa de lavado usando el tampón de equilibrado de matriz inmediatamente después de la etapa de carga hasta que la señal de UV regresó al valor basal. Se usó una etapa de elución con una solución con concentración salina más alta para eliminar las especies unidas de la matriz durante cada tanda cromatográfica. Las especies unidas contenían especies no deseadas de HMW, ADN, CHOP y otras impurezas. Las columnas se limpiaron con solución de NaOH 0,5 N después de cada tanda y se almacenaron en solución de NaOH 0,1 N.

Durante las etapas de carga y lavado, se fraccionó el flujo directo de cada tanda y se recogió en tubos cónicos de tamaño apropiado. La concentración de proteína en cada fracción se midió usando un espectrofotómetro UV-Vis. Los contenidos de impurezas tales como proteína de la célula hospedadora, ADN, proteína A lixiviada y gentamicina se determinaron en fracciones seleccionadas para cubrir todas las etapas de carga y lavado, como se discute anteriormente.

Procedimientos experimentales y resultados

Purificación del anticuerpo anti-VEGF usando SPSFF

Se obtuvieron los cromatogramas de SPSFF (0,66 cm D.I. x 5,5 cm de altura de lecho) con una cantidad de carga de producto de hasta 1000 mg/ml de CV a diversos caudales (9 CV/h, 8 CV/h y 36 CV/h) a pH 5,5, 5 mS/cm en

NaAC. Véase la Figura 19.

Los efectos de diversos caudales (9 CV/h, 18 CV/h y 36 CV/h) sobre las retiradas de CHOP, ADN y HMW en SPSFF con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV se evaluaron a pH 5,5 y 5 mS/cm. Como se muestra en la Figura 20, los caudales ensayados no afectaban significativamente a la retirada de CHOP. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 21 y 22, los caudales ensayados sí afectaban a las retiradas de ADN y HMW.

Purificación del anticuerpo anti-VEGF usando Poros HS50

Los efectos de diversos caudales (18 CV/h y 36 CV/h) sobre las retiradas de CHOP, ADN y HMW en Poros HS50 con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV se evaluaron a pH 5,5 y 5 mS/cm. Como se muestra en la Figura 23, los caudales ensayados no afectaban significativamente a las retiradas de HMW, CHOP y ADN.

La capacidad de unión a AcM de Poros HS50 se evaluó a diversas conductividades de carga (3 mS/cm, 5 mS/cm, 8 mS/cm, 13 mS/cm y 18 mS/cm) a pH 5,5 y 18 CV/h usando una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 mg/ml de CV. Como se muestra en la Figura 24, una mayor conductividad de carga se correlacionaba con una menor capacidad de unión a AcM.

Se obtuvieron los cromatogramas de Poros HS50 a diversas conductividades de carga (5 mS/cm, 8 mS/cm, 13 mS/cm, y 18 mS/cm) a pH 5,5. P1 muestra el pico de elución con NaAC 350 mM y P2 muestra el pico de limpieza con NaOH 0,5 N. Véase la Figura 25. Como se muestra en la Figura 25, existía una unión típica a Poros HS50 con las conductividades de carga de 5 mS/cm y 8 mS/cm. Además, existía unión parcial a 13 mS/cm. Véase la Figura 25. A 18 mS/cm, existía flujo directo típico. Véase la Figura 25.

La capacidad de Poros HS50 para retirar CHOP se examinó a pH 5,5 bajo diversas condiciones de conductividad (3 mS/cm, 5 mS/cm, 5 mS/cm cargada con CHOP diluido ~2 veces, 8 mS/cm, 13 mS/cm y 18 mS/cm) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 mg/ml de CV a 18 CV/h. Como se muestra en la Figura 26, la retirada de CHOP era más eficaz con una menor conductividad de carga.

La capacidad de Poros HS50 para retirar HMW se evaluó a pH 5,5 bajo diversas conductividades de carga (3 mS/cm, 5 mS/cm, 5 mS/cm y AcM diluido ~2 veces a 2,37 mg/ml, 8 mS/cm, 13 mS/cm, y 18 mS/cm) con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV y 18 CV/h. Como se muestra en la Figura 27, a 3 mS/cm, existía una menor cantidad de HMW unida a Poros HS50 al comienzo del procedimiento. A 13 mS/cm, la cantidad de HMW unida a Poros HS50 al comienzo del procedimiento era mayor y disminuía con el tiempo. Véase la Figura 27.

La capacidad de Poros HS50 para retirar ADN con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 mg/ml de CV se evaluó con varias conductividades de carga y caudales (3 mS/cm y 18 CV/h, 5 mS/cm y 18 CV/h, 5 mS/cm y 36 CV/h, 8 mS/cm y 18 CV/h, 13 mS/cm y 18 CV/h y 18 mS/cm y 18 CV/h) a pH 5,5. Las cantidades de ADN en la carga eran de aproximadamente 1000 pg/mg, 1000 pg/mg, 7000 pg/mg, 16821 pg/mg y 18566 pg/mg para las condiciones de conductividad de carga de 3 mS/cm, 5 mS/cm, 8 mS/cm, 13 mS/cm, y 18 mS/cm, respectivamente. Como se muestra en las Figuras 28 (A) y (B), Poros HS50 era capaz de unirse a ADN con las conductividades de carga ensayadas.

La capacidad de Poros HS50 para unirse a ADN con el producto cargado a 300 mg/ml de CV se evaluó también a pH 5,5 con elución en gradiente. Como se muestra en la Figura 29, el ADN se unía a la columna a pH 5,5 y 5 mS/cm y se eluía de la columna durante la elución en gradiente de sal lineal.

La capacidad de Poros HS50 (1,88 ml de resina) para retirar la gentamicina se evaluó a pH 5,5, 5 mS/cm y 18 CV/h con una cantidad variable del producto cargado hasta aproximadamente 990 g/l de CV. Como se muestra en la Tabla 4, Poros HS50 era capaz de retirar la gentamicina en el procedimiento sobrecargado.

Tabla 4.

ID de muestra	Producto recogido (g/l)	Gentamicina (pg/ml)	Gentamicina (pg/mg)
Carga	-	32,875	7,15
F5	65	<0,37	<0,08
F15	331	<0,37	<0,08
F30	727	<0,37	<0,08
F35	860	<0,37	<0,08
Eluato	-	321,25	20

La capacidad de Poros HS50 (1,88 ml de resina) para retirar la proteína A se evaluó a pH 5,5, 5 mS/cm y 18 CV/h

con una cantidad variable del producto cargado hasta aproximadamente 990 g/l de CV. Como se muestra en la Tabla 5, Poros HS50 era capaz de eliminar el lixiviado de proteína A en el procedimiento sobrecargado. La proteína A avanzaba por la columna a entre 727 y 860 g recogidos/l de CV. Véase la Tabla 5.

5

Tabla 5.

ID de muestra	Producto recogido (g/l)	Proteína A (ng/ml)	Proteína A (ng/mg)
Carga	-	22,17	4,82
F5	65	<9,8	<2,18
F15	331	<9,8	<2,17
F22	517	<9,8	<2,18
F30	727	<9,8	<2,20
F35	860	13,53	2,99
Eluato	-	1324,35	82,41

La capacidad de Poros HS50 para retirar HMW, CHOP y ADN con diferentes alturas de lecho de columna (altura de lecho de 4,6 cm y altura de lecho de 14,2 cm) se evaluó a pH 5,5, 5 mS/cm y 18 CV/h con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 mg/ml de CV. Como se muestra en la Figura 30, las alturas de lecho de columna ensayadas (4,6 cm y 14,2 cm) no tenían efectos significativos sobre la retirada de HMW, CHOP o ADN. Además, las alturas de lecho de columna de 4,6 cm y 14,2 cm mantenían el mismo tiempo de residencia (3 minutos).

La distribución de las variantes cargadas en las fracciones de elución de la columna Poros HS50 (1,88 ml) se evaluó a pH 5,5, 5 mS/cm y 18 CV/h, con una cantidad variable del producto cargado hasta 1000 g/l de CV. Las variantes básicas se trataron con CPB (carboxipeptidasa B) antes de efectuar el análisis de la variante cargada. Como se muestra en la Tabla 6, la distribución de las variantes cargadas (las variantes ácidas y básicas) y de las variantes principales en el conjunto final no varió sustancialmente. Existía un mayor porcentaje de variante ácida en el flujo directo a la cantidad de carga baja. Véase la Tabla 6. Poros HS50 era capaz de unirse a alguna variante básica. Véase la Tabla 6.

15
20**Tabla 6.**

	Ácido (%)	Principal (%)	Básico (%)
Carga	28,54	60,91	10,54
AcM recogido por CV en fracción (g/l de cv)			
65	32,87	62,76	4,37
331	29,78	59,21	11,01
727	29,53	58,05	12,42
833	29,62	57,6	12,78
Conjunto de elución (60,8 mg/ml de CV)	8,36	32,42	59,22

25 Ejemplo 3 - Purificación de polipéptidos usando cromatografía de modo mixto

Este ejemplo describe un procedimiento de cromatografía de modo mixto para purificar anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20.

30 Materiales y procedimientos

Procedimientos de purificación

Los conjuntos de proteínas filtradas y equilibradas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 para la siguiente cromatografía de modo mixto. Los conjuntos se ajustaron a pH de 5 a 8,5 con base Tris 1,5 M o ácido acético glacial 2 N. Las concentraciones de cloruro se ajustaron de 0 mM a 250 mM con la adición de NaCl 3 M. Se utilizaron las condiciones específicas de cromatografía de modo mixto como se indica en la sección *Procedimientos experimentales y resultados* a continuación.

40 Procedimientos experimentales y resultados

El rendimiento de la resina de modo mixto, por ejemplo Capto Adhere, se evaluó usando anticuerpos múltiples, anticuerpo anti-VEGF (70 mg/ml de resina), anticuerpo anti-CD11a (90 mg/ml de resina) y anticuerpo anti-CD20 (90 mg/ml de resina) a diversos pH y condiciones salinas en un experimento de cribado de alto rendimiento. La cantidad de CHOP (ppm) y el % de HMW en los conjuntos purificados de proteína A filtrada y equilibrada era de 497 y 7,6 (para el anticuerpo anti-VEGF), 820 y 6,4 (para el anticuerpo anti-CD11a) y 4720 y 3,5 (para anticuerpo anti-CD20). Las Figuras 31, 32 y 33 muestran los resultados para la recuperación de AcM, la unión de HMW a la

45

resina y la unión de CHOP a la resina, respectivamente, a diversos pH y condiciones salinas. Como se muestra en la Figura 31, el aumento del pH y de la conductividad aumentó la unión de AcM a la resina Capto Adhere para el anticuerpo anti-VEGF y el anticuerpo anti-CD20. El pH tuvo efectos significativos sobre la capacidad de Capto Adhere para unirse al anticuerpo anti-CD11a. Véase la Figura 31. El aumento del pH aumentaba el porcentaje de especies de HMW unidas a la resina Capto Adhere para el anticuerpo anti-VEGF, el anticuerpo anti-CD11a y el anticuerpo anti-CD20. Véase la Figura 32. El pH tenía efectos más significativos que la conductividad sobre la capacidad de Capto Adhere para unirse a HMW. Véase la Figura 32. La resina Capto Adhere era capaz de unirse a CHOP con los intervalos más amplios de pH y conductividad. Como se muestra en la Figura 33, más del 80 % de CHOP se unía a la resina para la mayoría de los gráficos de contorno para anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-CD11a y anticuerpo anti-CD20.

El rendimiento de Capto Adhere en el experimento de cribado de alto rendimiento y en la cromatografía en columna para la purificación de anticuerpo anti-VEGF se resume en la Tabla 7. En general, las observaciones realizadas en el experimento de alto rendimiento se correlacionaban con los resultados obtenidos a partir del experimento de cromatografía en columna.

Tabla 7.

pH	Condo	% de AcM en FT		% de HMW en FT		% de HMW unido		CHOP (ppm) en FT		% de CHOP unido	
		Placa de pocillo	Columna								
5,0	5,0	93	100	5,9	5,1	-13,8	7,8	23,0	36,0	93,4	93,0
7,0	5,0	67	76	4,4	4,6	35,4	37,4	10,4	12,8	97,4	96,9
8,0	5,0	27	28	1,2	1,7	83,3	77,9	17,3	31,3	95,3	92,7
8,0	19,4	23	21	1,9	6,9	71,0	40,1	71,1	154,9	79,6	70,9
8,5	5,0	13	22	0,9	2,3	86,0	73,9	23,7	85,0	93,4	83,9

La capacidad de Capto Adhere para retirar CHOP y HMW se examinó también en la cromatografía en columna para la purificación de anti-CD11a a pH 5,5 y 5 mS/cm. La resina Capto Adhere era capaz de reducir los niveles de CHOP a menos de 20 ppm cuando el producto se cargaba a aproximadamente 700 mg/ml de resina; sin embargo, Capto Adhere no podía reducir el % de HMW. Datos no mostrados.

Ejemplo 4 - Purificación del anticuerpo anti-CD11a usando una combinación de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado y cromatografía de intercambio aniónico estándar

Este ejemplo describe un procedimiento que usa una combinación de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado y cromatografía de intercambio aniónico estándar para purificar un anticuerpo CD11a humanizado recombinante.

Materiales y procedimientos

El fluido de cultivo celular que contenía el anticuerpo monoclonal producido en células de ovario de hámster chino se procesó mediante centrifugación continua para retirar los desechos celulares y se clarificó adicionalmente mediante filtración con filtros de profundidad y filtro de 0,2 µm. El anticuerpo anti-CD11a se purificó mediante a) intercambio catiónico sobrecargado en tanda de desarrollo: (i) purificación por proteína A (Prosep vA), (ii) purificación por intercambio catiónico (CEX) (Poros HS50, en modo sobrecargado) y (ii) intercambio aniónico (AEX) (QSFF) o (b) un procedimiento comercial de (i) purificación por proteína A (Prosep vA), (ii) CEX (SPSFF) y (ii) AEX (QSFF). Las condiciones de ejecución se enumeran en la Tabla 8.

Tabla 8.

Etapa de purificación	Procedimiento comercial			CEX sobrecargado en tanda de desarrollo		
	Modo operativo	Condición operativa	Densidad de carga (g/l de CV)	Modo operativo	Condición operativa	Densidad de carga (g/l de CV)
Proteína A	B/E	STD	8-20	B/E	STD	8-20
CEX	B/E	pH 5,5, carga 4,7 mS/cm, elución 13,25 mS/cm	15-40	Sobrecargado	pH 5,5, 5 mS/cm	600
AEX	FT	pH 8,0, 6,9 mS/cm	15-70	FT	pH 8,0, 5 mS/cm	70

Procedimientos experimentales y resultados

5 Se evaluó el rendimiento del procedimiento que combina CEX sobrecargado con AEX con respecto a la retirada de CHOP y la recuperación de AcM. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9.

Etapa de purificación	Procedimiento comercial		CEX sobrecargado en tanda de desarrollo		
	CHOP (ng/mg)	Monómero (%)	CHOP (ng/mg)	Monómero (%)	Rendimiento [%]
Proteína A	677-939	94,7-95,9	995	93,4	
CEX	116-183	99,3-99,8	158	99,7	90
AEX	<22,2	99,7-99,8	2	99,7	95
En bruto	<1,48	99,6-99,7			

10 La capacidad de Poros HS50 y QSFF para retirar HMW, CHOP, gentamicina, ADN y Proteína A lixiviada se evaluó en dos condiciones: (a) Poros HS50 a pH 5,5, 3,5 mS/cm y QSFF a pH 8,0, 3,5 mS/cm y (b) Poros HS 50 a pH 5,5, 5,0 mS/cm y QSFF a pH 8,0, 5,0 mS/cm. Los resultados para las condiciones (a) y (b) se resumen en la Tabla 10 y la Tabla 11, respectivamente. La gentamicina, el ADN y la proteína A lixiviada se retiraron por debajo de los límites de detección. La retirada de CHOP era mejor en la condición (a) que en la condición (b). La retirada de HMW era mejor en la condición (b) que en la condición (a). El rendimiento del producto era de al menos 90 % para cada etapa de cromatografía.

Tabla 10.

Etapa	HMW (%)		CHOP (ppm)		Gentamicina (ng/ml)		ADN (ng/mg)		ProA lixiviada (ng/mg)	
	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
POROS HS50	6,4	1,42	1168	55	9,1	<0,1	0,3	0,3	25	<2
QSFF	1,42	1,41	55	2	<0,1	<0,1	0,5	0	<2	<2

Tabla 11.

Etapa	HMV (%)		CHOP (ppm)		Gentamicina (ng/ml)		ADN (ng/mg)		ProA lixiviada (ng/mg)	
	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
POROS HS50	6,59	0,28	664	133	5	<0,1	0,3	<LTR	21	<2
QSFF	0,28	0,3	133	2	<0,1	<0,1	<LTR	<LTR	<2	<2

Ejemplo 5 - Purificación usando una combinación de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado y cromatografía de modo mixto

Este ejemplo describe un procedimiento que usa una combinación de cromatografía de intercambio catiónico sobrecargado y cromatografía de modo mixto para purificar un anticuerpo anti-CD11a y un anticuerpo anti-CD20.

Materiales y procedimientos

Los conjuntos de proteínas filtradas y equilibradas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 para la cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de modo mixto posteriores. Se utilizaron las condiciones de cromatografía de intercambio catiónico y/o de cromatografía de modo mixto específicas como se indica en la sección de *Procedimientos experimentales y resultados* a continuación.

Procedimientos experimentales y resultados

Purificación de anti-CD11a

Experimento 1: El producto filtrado y equilibrado descrito anteriormente se purificó usando una columna Poros HS50 sobrecargada y una columna Capto Adhere con aproximadamente ~600 g/l de CV de producto cargado para Poros HS50 y aproximadamente ~100 g/l de CV para Capto Adhere a pH 5,5, 5 mS/cm, y 100 cm/h. El experimento se efectuó en dos secuencias diferentes: a) secuencia A: (i) columna Poros HS50 (0,66 cm x 5 cm) y (ii) Capto Adhere (1,5 cm x 20 cm) o b) secuencia B (i) Capto Adhere (0,66 cm x 20 cm) y (ii) columna Poros HS50 (0,66 cm

x 5 cm). Para la secuencia A, las densidades de carga para la columna Poros HS50 y la columna Capto Adhere eran de 600 mg/ml de resina y 106 mg/ml de resina, respectivamente. Para la secuencia B, las densidades de carga para la columna Capto Adhere y la columna Poros HS50 eran de 100 mg/ml de resina y 569 mg/ml de resina, respectivamente.

Los resultados sobre la retirada de impurezas se resumen en la Tabla 12 para la secuencia A y en la Tabla 13 para la secuencia B. Los rendimientos de recuperación de producto y los resultados sobre la retirada de impurezas para ambos procedimientos cumplieron con la pureza y el rendimiento del procedimiento comercial.

Tabla 12: Secuencia A.

Descripción de la etapa	Recuperación de etapa	Conc. de CHOP (ppm)		% de HMW	
		Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Poros HS	96	659	110	6,4	0,5
Capto Adhere	100	110	3	0,5	0,4

Descripción de la etapa	ADN (pg/mg)		ProA lixiviada (ppm)		Gentamicina (ppm)	
	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Poros HS	137,6	<2	27	<2	46,8	<1
Capto Adhere	<2	<2	<2	<2	<1	<1

Tabla 13: Secuencia B.

Descripción de la etapa	Recuperación de etapa	Conc. de CHOP (ppm)		% de HMW	
		Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Capto Adhere	102	659	16	6,4	6,2
Poros HS	90	16	2	6,2	0,3

Descripción de la etapa	ADN (pg/mg)		ProA lixiviada (ppm)		Gentamicina (ppm)	
	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Capto Adhere	137,6	1,1	27	<2	46,8	<1
Poros HS	1,1	<2	<2	<2	<1	<1

Experimento 2: El producto filtrado y equilibrado descrito anteriormente se purificó continuamente usando Capto Adhere (0,66 cm x 5,2 cm) y, a continuación, la columna Poros HS50 (0,66 cm x 4,8 cm) con aproximadamente 566 g/l de CV de producto cargado para Poros HS50 y aproximadamente 614 g/l de CV para Capto Adhere a pH 5,5, 5 mS/cm, y 100 cm/h en las condiciones indicadas en la tabla siguiente.

Tabla 14: Condiciones cromatográficas usadas en el procesamiento continuo del anticuerpo anti-CD11a.

Fase	Tampón/solución	Parámetro del procedimiento
Equilibrado	NaAc 77 mM, pH 5,5, 5 mS/cm	5 CV de la resina Poros HS50 o Capto Adhere
Carga	Conjunto de proteína A acondicionada (pH 5,5 y 5 mS/cm)	Cargar hasta 614 g/l de resina Poros HS50; empezar a reunir a OD280 ≥ 0,5; terminar de reunir a OD280 ≤ 0,5
Lavado	NaAc 77 mM, pH 5,5, 5 mS/cm	≥ 2 CV de la columna Poros HS50 o Capto Adhere
Eliminación 1	NaCl 2 M	5 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere
Eliminación 2	Tampón acetato 0,15 M, pH 2,8	5 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere
Desinfección	NaOH 0,5 N	4 CV de columna Poros HS50 o Capto Adhere
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	3 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere

Los resultados del cromatograma para el procesamiento continuo se muestran en la Figura 34. El procesamiento continuo dio como resultado un rendimiento de recuperación de AcM de aproximadamente un 90 %. Datos no mostrados. Además, había 617 ppm de CHOP en la carga, pero sólo 3,4 ppm en el conjunto, había 6,37 % de HMW en la carga, pero sólo 0,6 % en el conjunto (90 % de retirada de HMW) y el ADN, el lixiviado de proteína A y la gentamicina estaban por debajo de los límites de detección.

Purificación de anti-CD20

Experimento 1: El conjunto de productos de la cromatografía de afinidad por proteína A se purificó usando la columna Poros HS50 (0,66 cm x 5 cm) con aproximadamente 600 g/l de CV de producto cargado y la columna

Capto Adhere (0,66 cm x 8 cm) con aproximadamente 316 g/l de CV para Capto Adhere a pH 5,5, 5 mS/cm, y 100 cm/h.

5 Los resultados se proporcionan en la Tabla 15 a continuación. La columna Poros HS sobrecargada daba como resultado una reducción del ~50 % del % de HMW y una reducción del 98 % de CHOP. Poros HS50 era la mejor resina comparada con SE Hicap, SPFF, SPXL y Capto S en la reducción del % de HMW (datos no mostrados). La columna Capto Adhere no proporcionó una reducción adicional del % de HMW, pero se observaba una reducción del CHOP del 99 % (se observaba mejoría para CHOP).

10

Tabla 15.

Resina	Recuperación de etapa	% de HMW		CHOP (ppm)	
		Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Poros 50 HS	90	3,8	1,7	3812	72
Capto Adhere	100	3,5	3,4	4722	49

15

Experimento 2: El producto filtrado y equilibrado descrito anteriormente se purificó continuamente usando una columna Poros HS50 sobrecargada (0,66 cm x 4,8 cm) y una columna Capto Adhere (0,66 cm x 7 cm) con aproximadamente ~600 g/l de CV de producto cargado para Poros HS50 y aproximadamente ~340 g/l de CV para Capto Adhere a pH 5,5, 5 mS/cm y 100 cm/h. El experimento se efectuó en dos secuencias diferentes: a) secuencia A: (i) columna Poros HS50 y (ii) Capto Adhere o b) secuencia B (i) Capto Adhere y (ii) columna Poros HS50 en las condiciones indicadas en la tabla siguiente.

20

Tabla 16: Condiciones cromatográficas usadas en el procesamiento continuo del anticuerpo anti-CD20.

Fase	Tampón/solución	Parámetro del procedimiento
Equilibrado	NaAc 77 mM, pH 5,5, 5 mS/cm	5 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere
Carga	Conjunto de proteína A acondicionada a pH 5,5 y 5 mS/cm	Cargar hasta 600 g/l de resina Poros HS50 (equivale a 340 g/l de resina Capto Adhere); empezar a reunir a OD280 \geq 0,5; terminar de reunir a OD280 \leq 0,5
Lavado	NaAc ~80 mM, pH 5,5, 5 mS/cm	\geq 2 CV de columna Poros HS50 o Capto Adhere
Eliminación 1	NaCl 2 M	5 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere
Eliminación 2	Tampón acetato 0,15 M, pH 2,8	5 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere
Desinfección	NaOH 0,5 N	4 CV de columna Poros HS50 o Capto Adhere
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	3 CV de resina Poros HS50 o Capto Adhere

25

Los resultados se proporcionan en la Tabla 17 a continuación. El procesamiento continuo daba como resultado un rendimiento de recuperación de AcM de aproximadamente un 90 % (Poros HS50 seguido de Capto Adhere) y aproximadamente un 87 % (Capto Adhere seguido de Poros HS50). La columna Poros HS sobrecargada daba como resultado una reducción de ~59 % en el % de HMW, la CHOP se reducía a menos de 10 ppm y el ADN, la proteína A lixiviada y la gentamicina estaban por debajo de los límites detectables.

30

Tabla 17.

Orden de etapa	Recuperación de etapa (%)	% de HMW		Conc. de CHOP (ppm)	
		Carga	Conjunto	Carga	Conjunto
Poros HS / Capto Adhere	92	3,7	1,5	5607	5
Capto Adhere / Poros HS	87	3,7	1,5	4797	6

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar un anticuerpo, que es un anticuerpo monoclonal, a partir de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, en el que el procedimiento comprende cargar la composición sobre un material de intercambio catiónico a una densidad de carga mayor que aproximadamente 150 g/l de material de intercambio catiónico, en el que el material de intercambio catiónico son partículas de resina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende usar un tampón de equilibrado, un tampón de carga y un tampón de lavado, en el que el material de cromatografía se equilibra con el tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar, el tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición que comprende el anticuerpo sobre un material de cromatografía, y el tampón de lavado se usa después de cargar la composición sobre el material de cromatografía para eluir el anticuerpo de la fase sólida, y en el que, al procedimiento para purificar el anticuerpo, le siguen las etapas de: eliminar las partículas de resina con un tampón con una concentración más alta de sal para retirar el contaminante unido; limpiar las partículas de resina con un tampón que comprende NaOH aproximadamente 0,5 N; y almacenar las partículas de resina en un tampón que comprende NaOH aproximadamente 0,1 N.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo tiene un pI de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10, en particular, donde el anticuerpo tiene un pI de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno, en particular, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es:
- (I) un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano; o
 - (II) un anticuerpo monoclonal IgG.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el al menos un contaminante es una cualquiera o más de proteína de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina y contaminante vírico.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la densidad de carga es entre aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 2000 g/l de material de intercambio catiónico, en particular, en el que la densidad de carga es entre aproximadamente 500 g/l y aproximadamente 1000 g/l de material de intercambio catiónico.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el material de intercambio catiónico comprende un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico, en particular, donde el grupo funcional es sulfopropilo, sulfoisobutilo o carboxilo.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el material de intercambio catiónico es Mustang S, Sartobind S, S03 Monolith, S Ceramic HyperD, Poros HS50, Poros HS20, sulfopropil-Sepharose Fast Flow (SPSFF), SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel S03 o Fractogel COO.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el procedimiento comprende el uso de un tampón de equilibrado, un tampón de lavado y/o un tampón de carga con el material de intercambio catiónico, y la conductividad del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 25 mS/cm, en particular, en el que la conductividad del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 3 mS/cm y aproximadamente 8 mS/cm.

ES 2 991 883 T3

- 5 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el procedimiento comprende el uso de un tampón de equilibrado, un tampón de lavado y/o un tampón de carga con el material de intercambio catiónico y el pH del tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el tampón de equilibrado, el tampón de lavado y/o el tampón de carga con el material de intercambio catiónico son los mismos.
- 10 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende usar un tampón de acetato de sodio o un tampón de cloruro de sodio.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se modifica la concentración de sal de los diversos tampones para lograr la conductividad deseada.

DIBUJOS

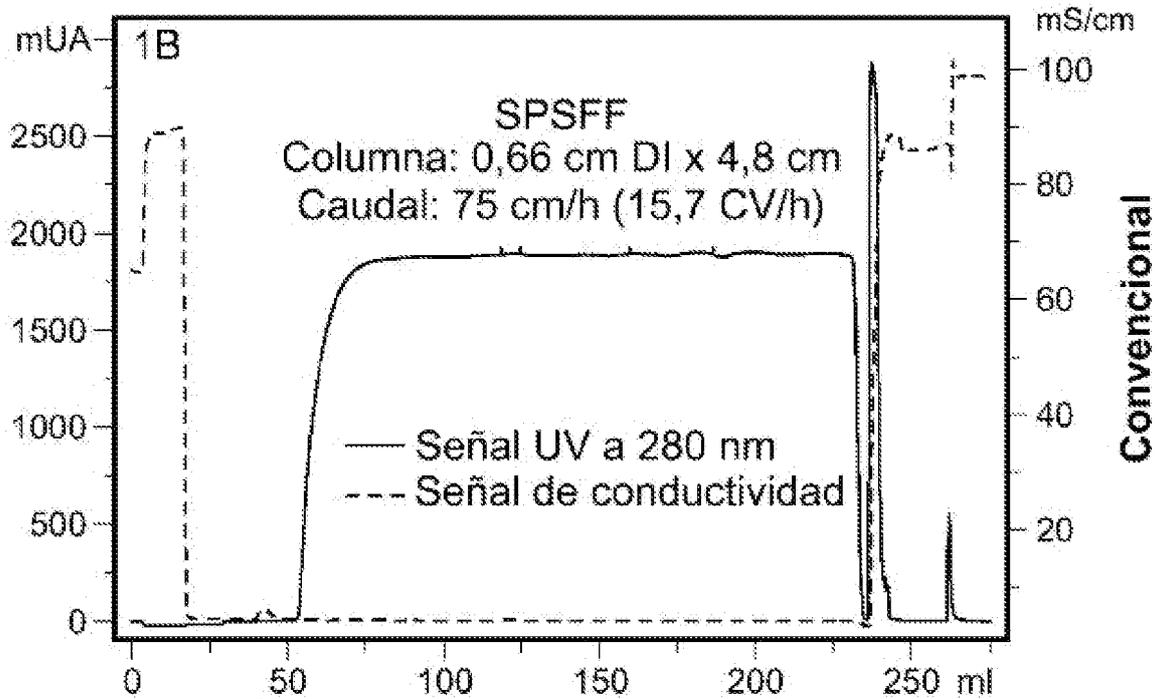
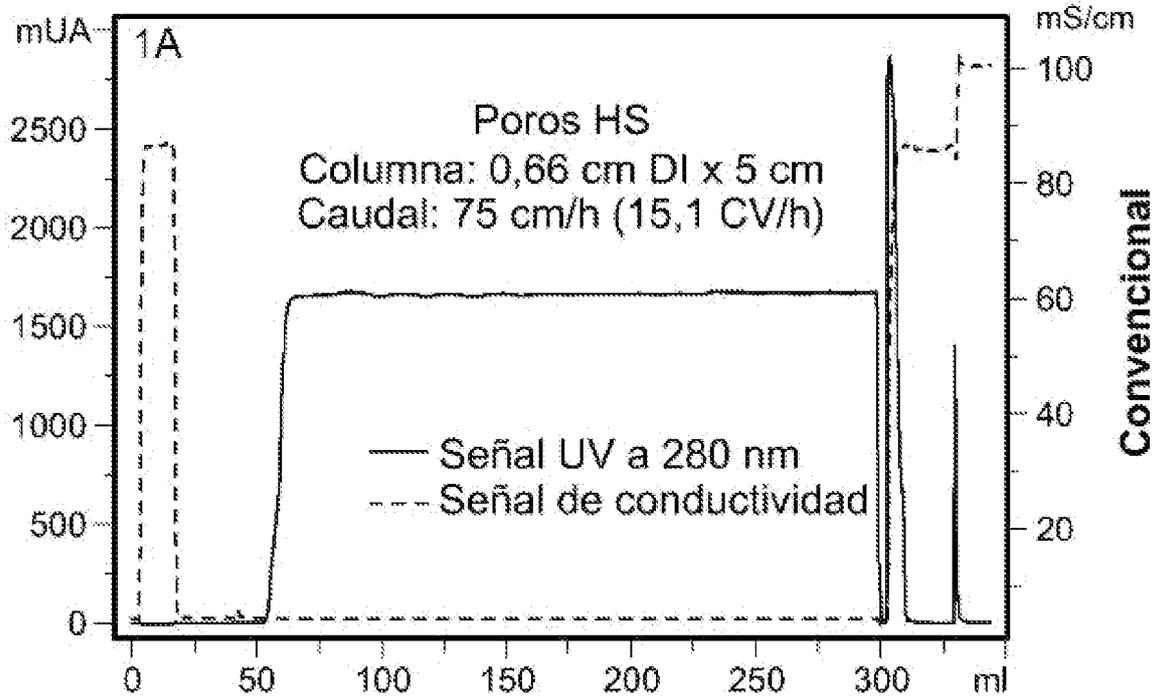


FIG. 1

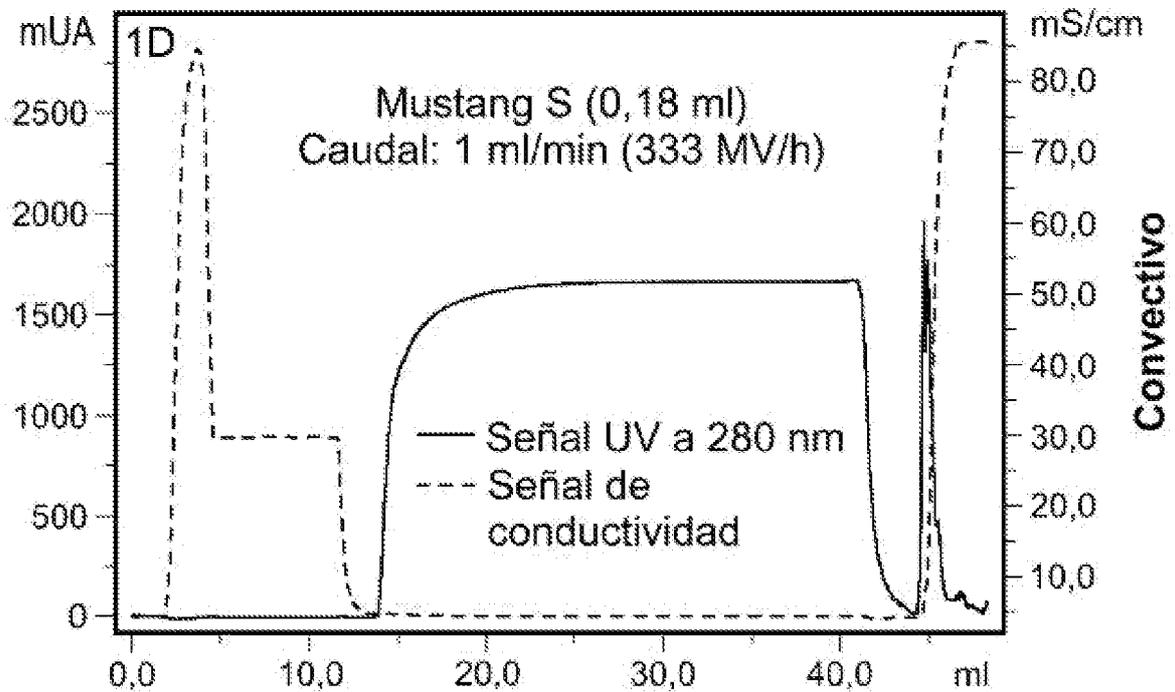
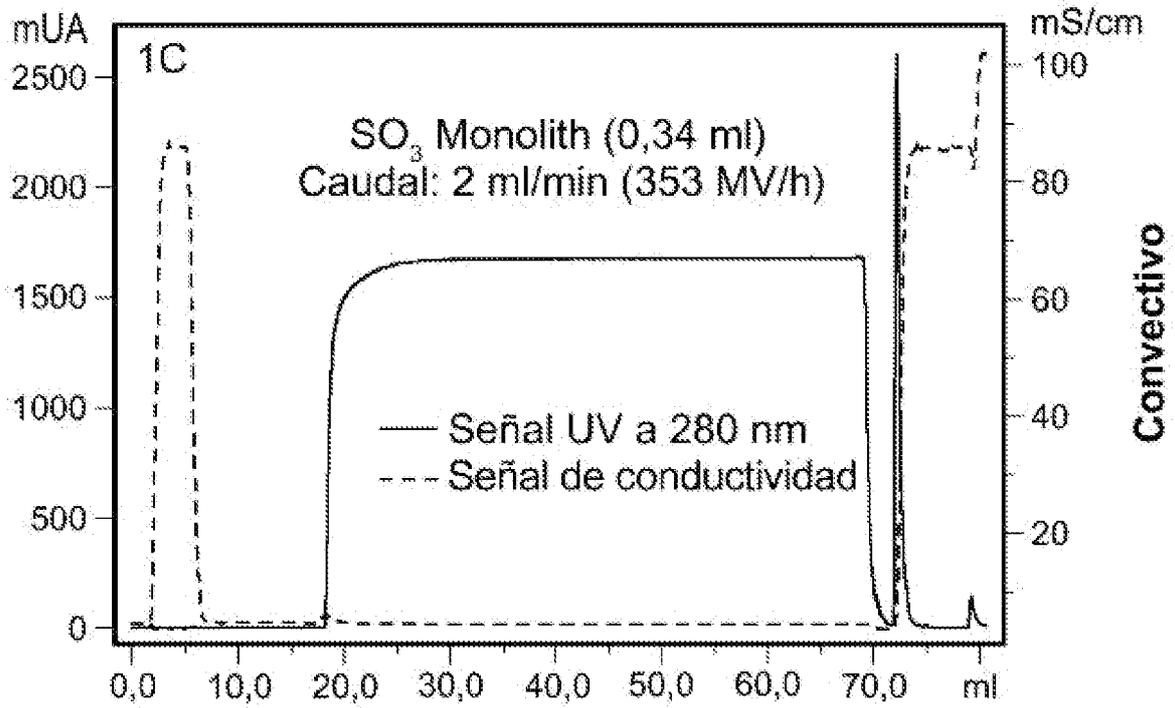


FIG. 1 (Cont.)

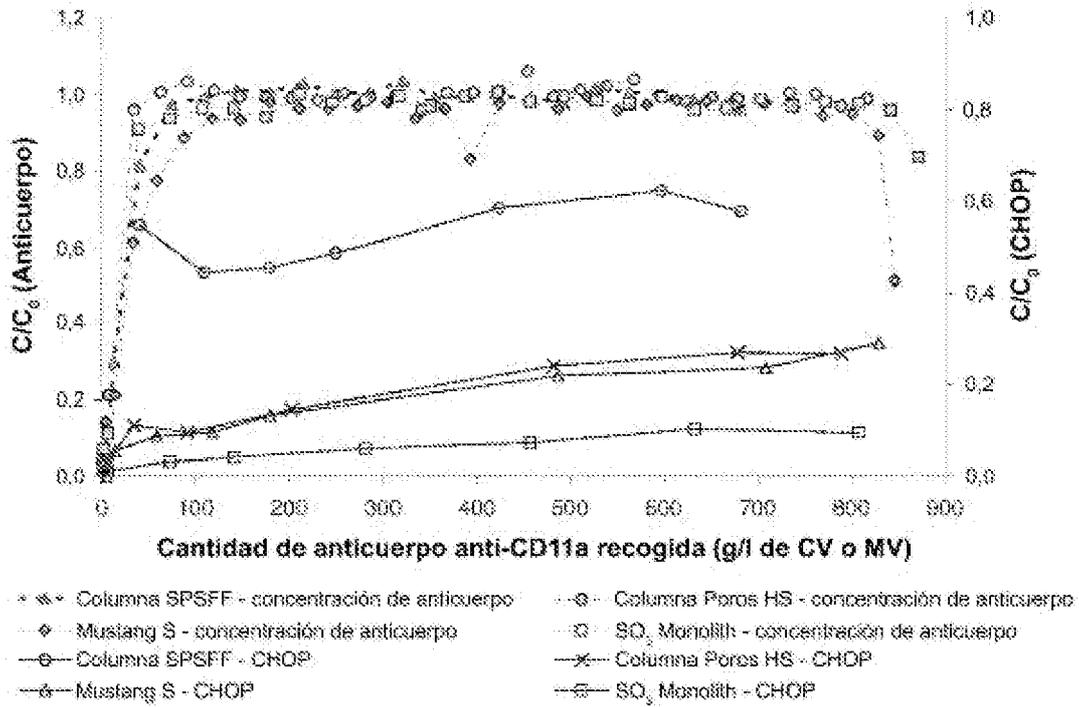


FIG. 2

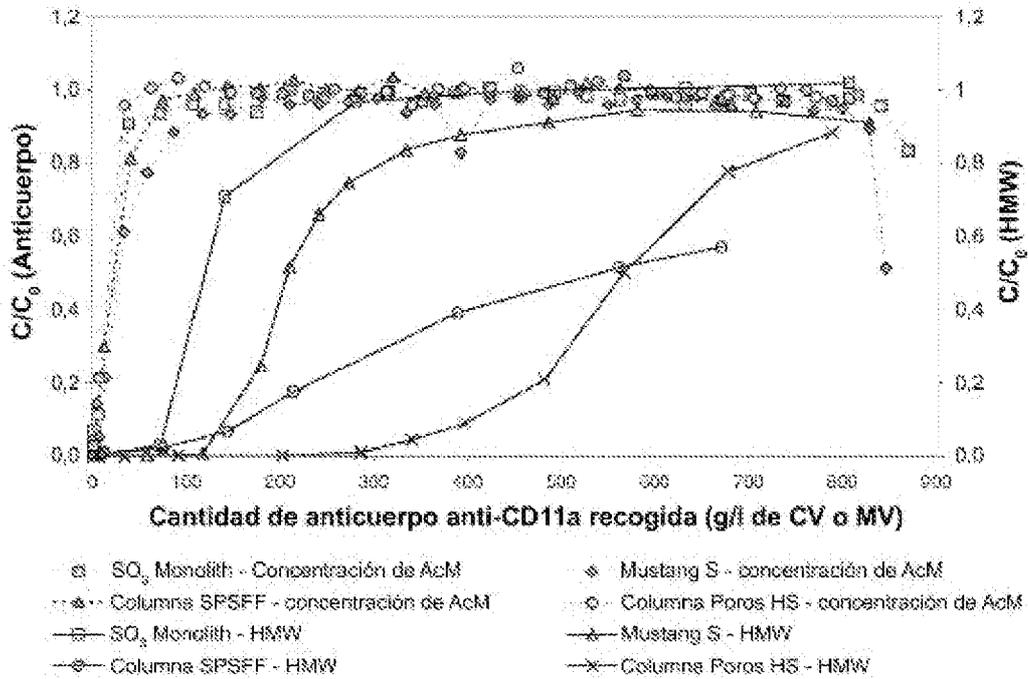


FIG.3

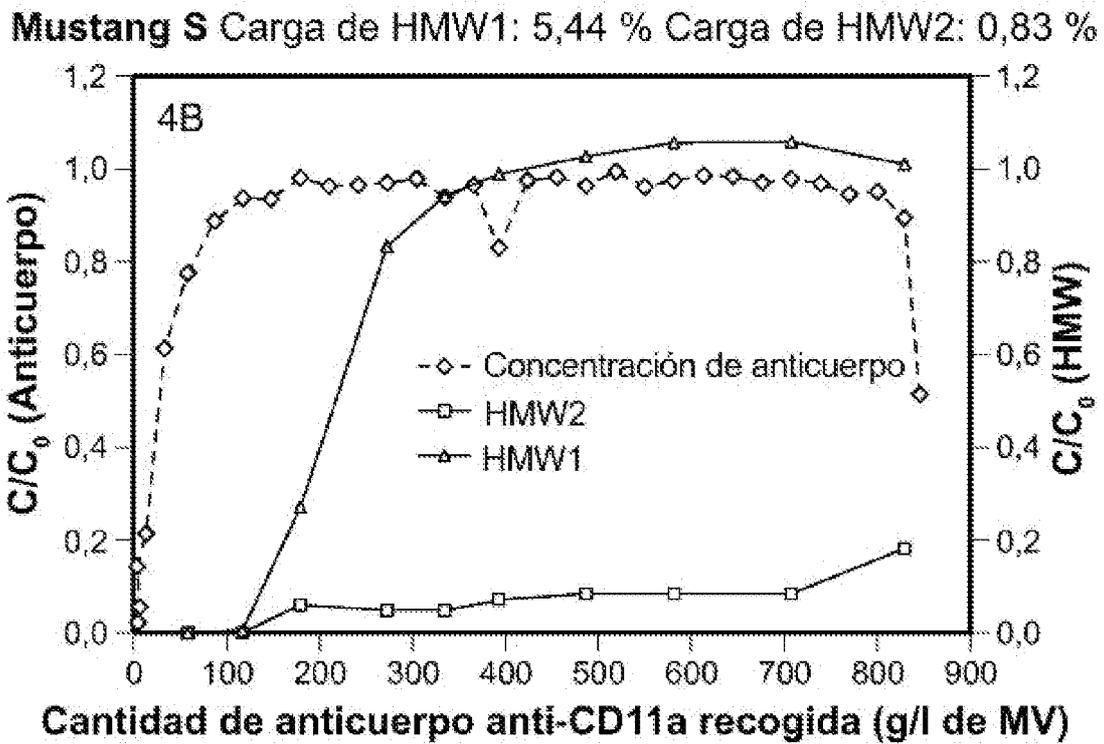
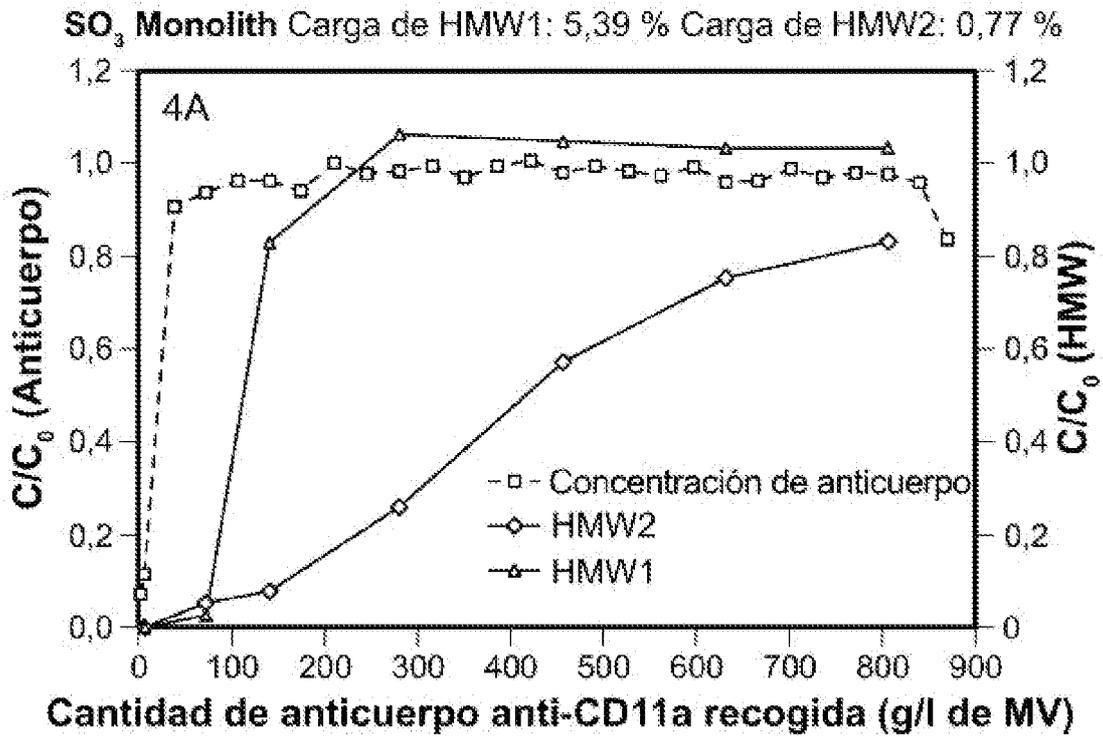


FIG. 4

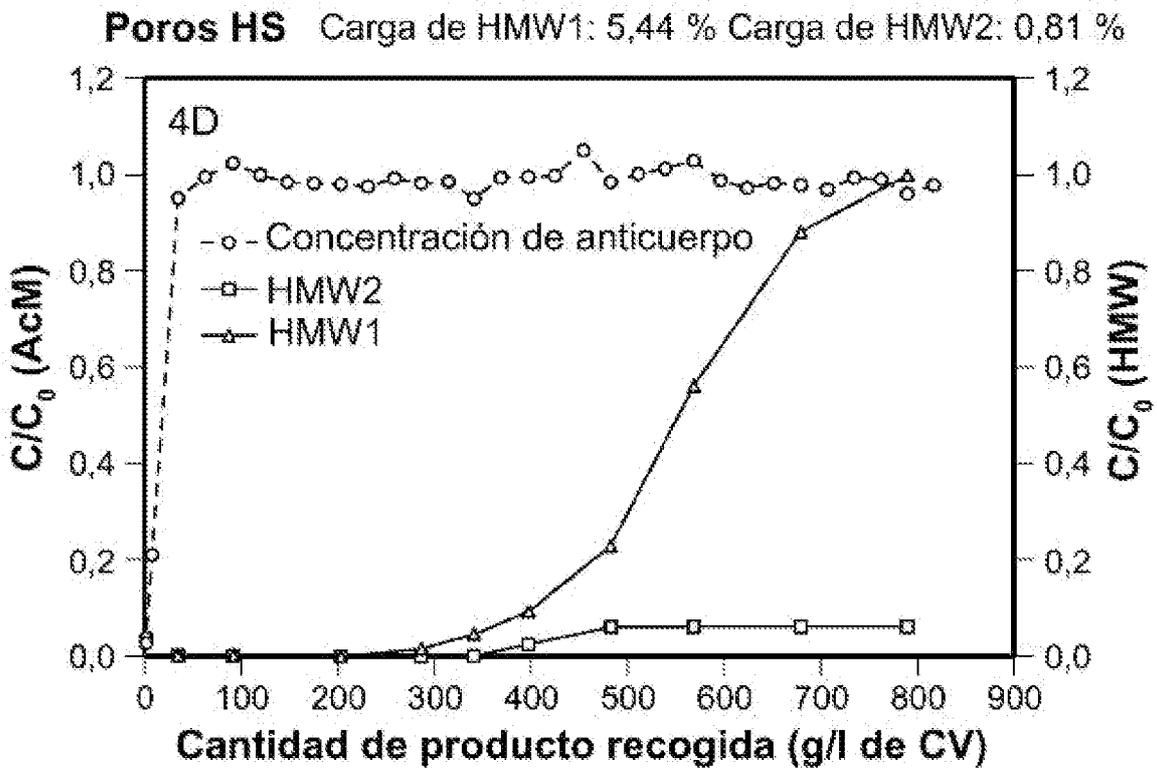
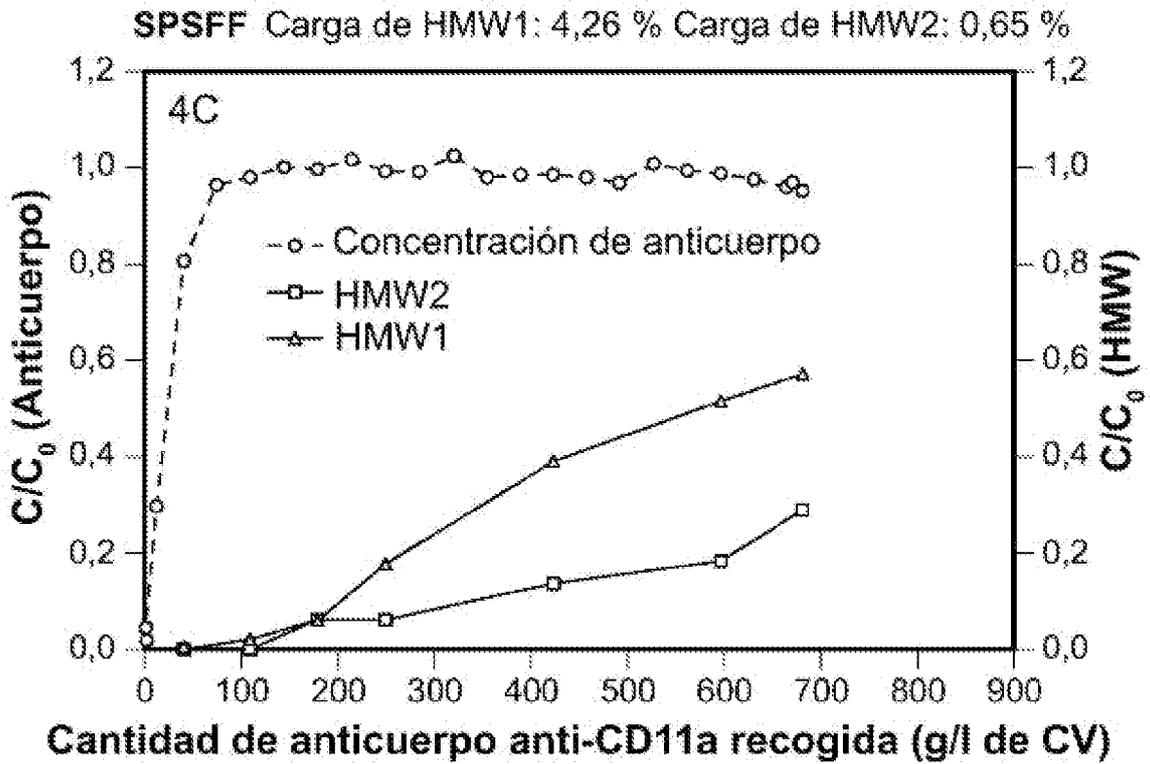


FIG. 4 (Cont.)

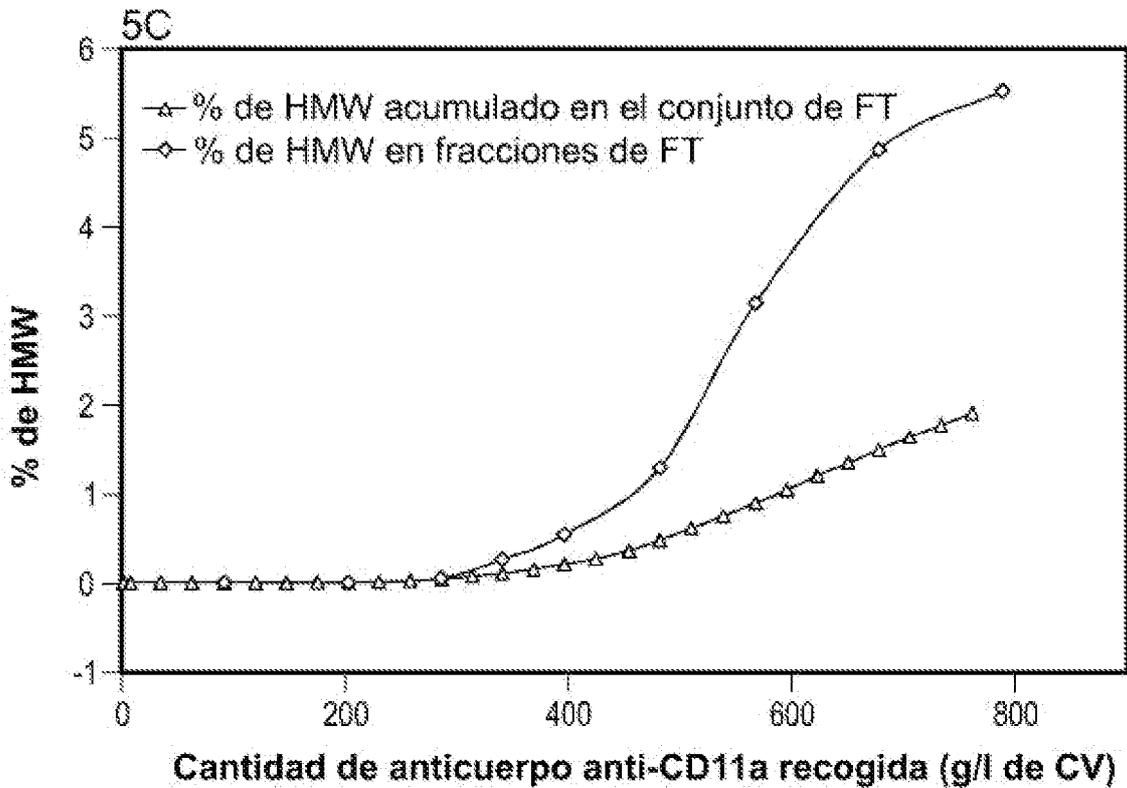
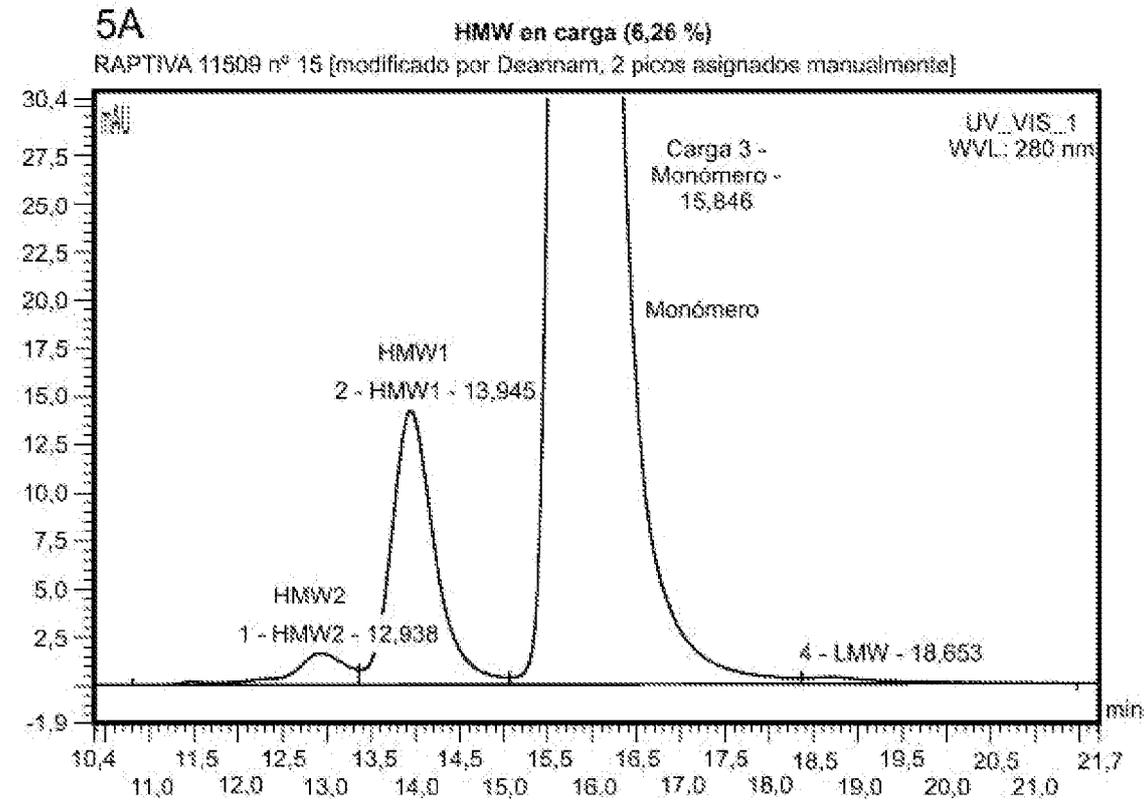


FIG. 5

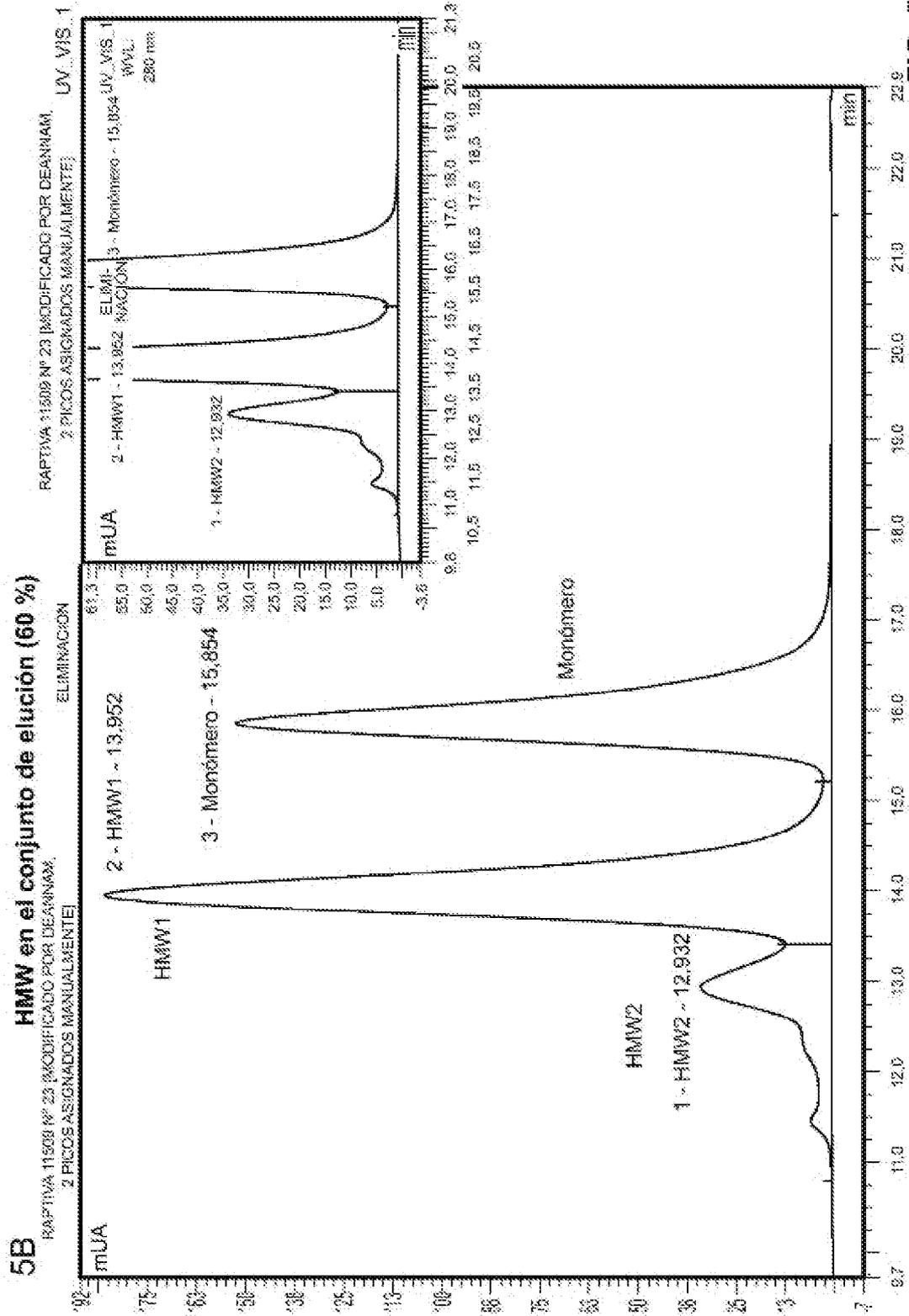


FIG. 5 (Cont.)

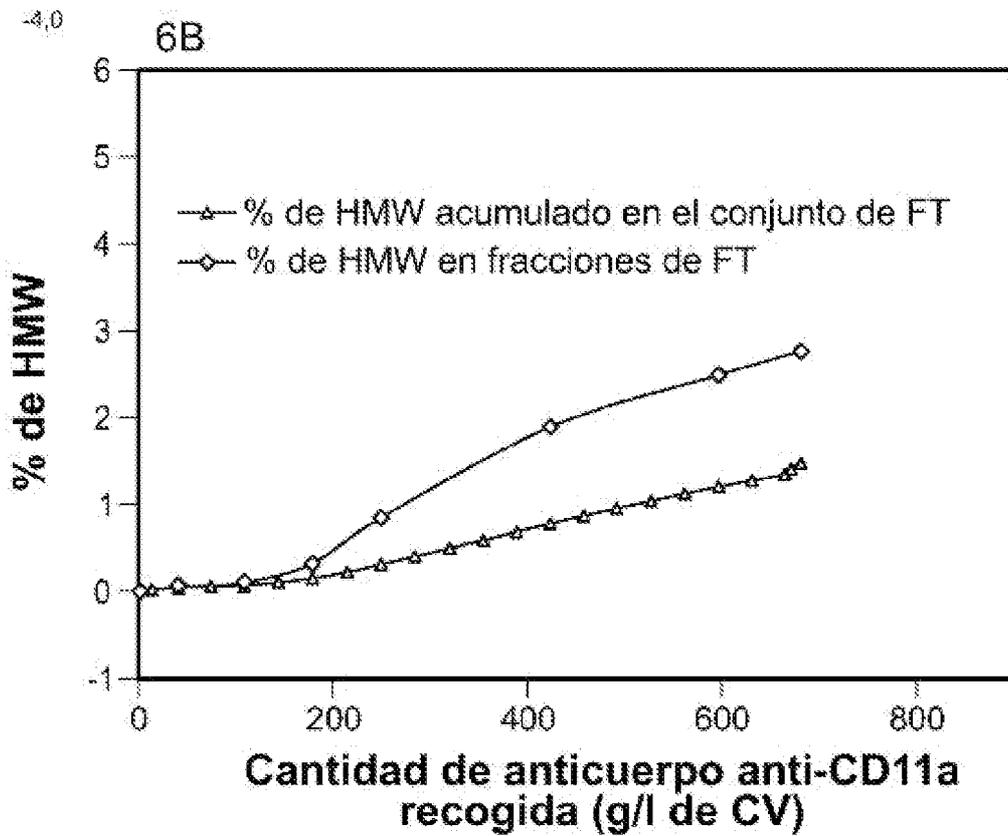
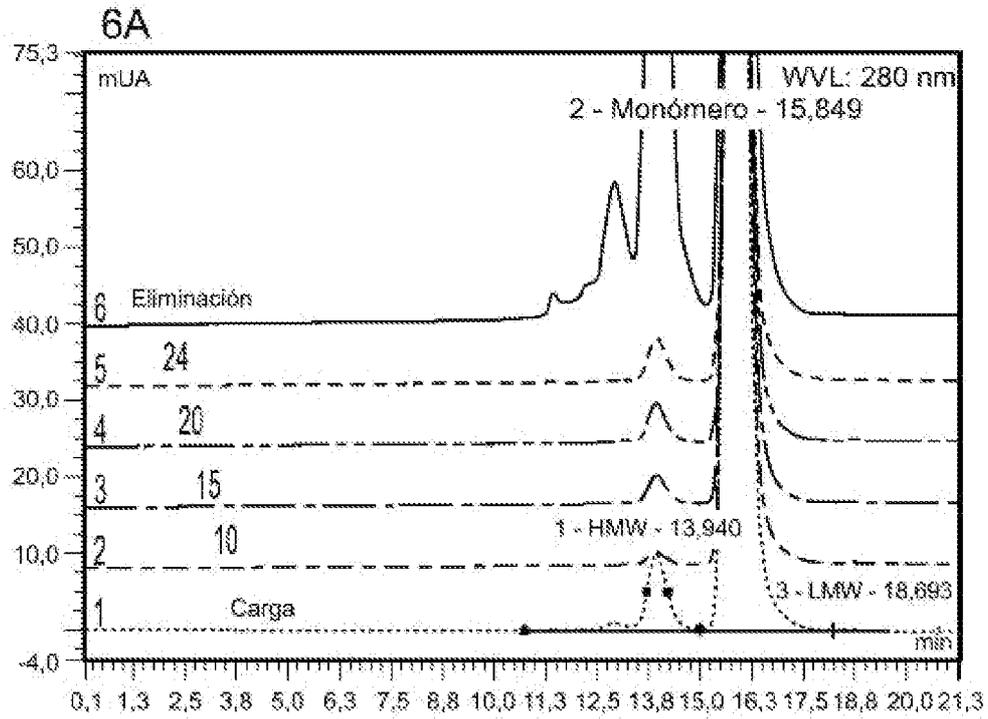


FIG. 6

6C

ID de muestra	Anti-CD11a recogido (g/l de CV)	% de HMW
Carga	-	4,83
2	2,20	n.a.
4	40,9	0,05
6	109	0,10
8	179	0,32
10	250	0,85
15	424	1,89
20	597	2,49
24	681	2,76
Eliminación	-	35,3

FIG. 6 (Cont.)

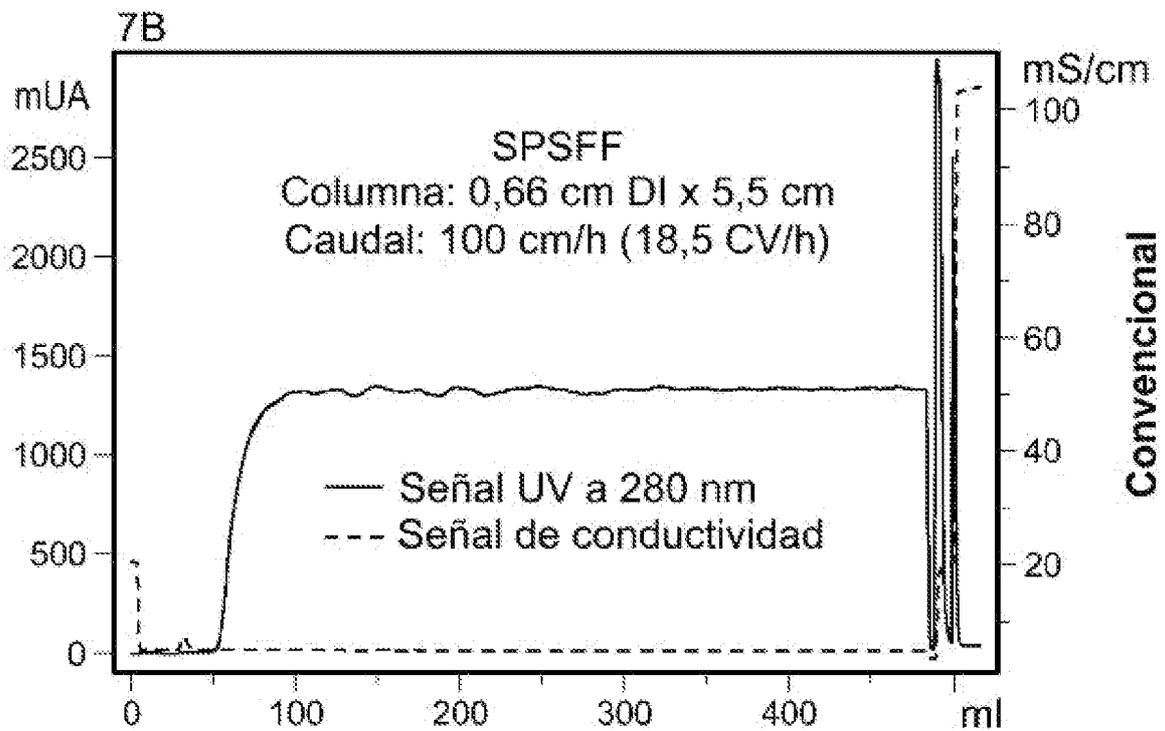
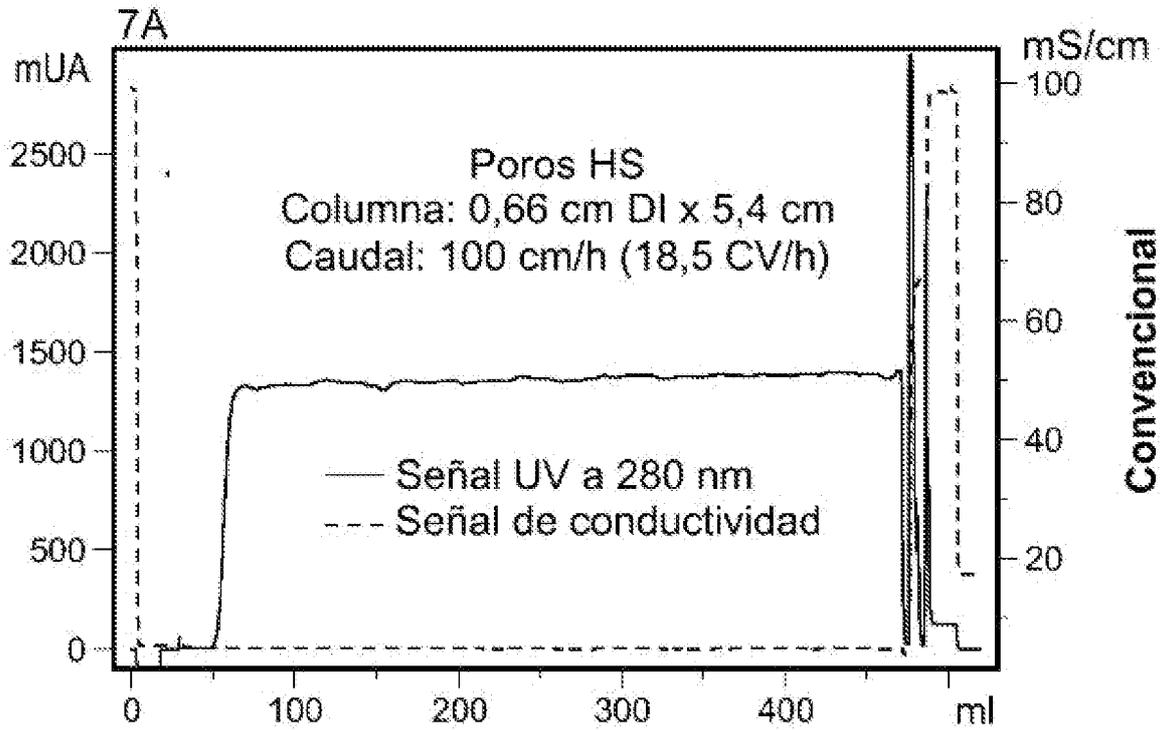


FIG. 7

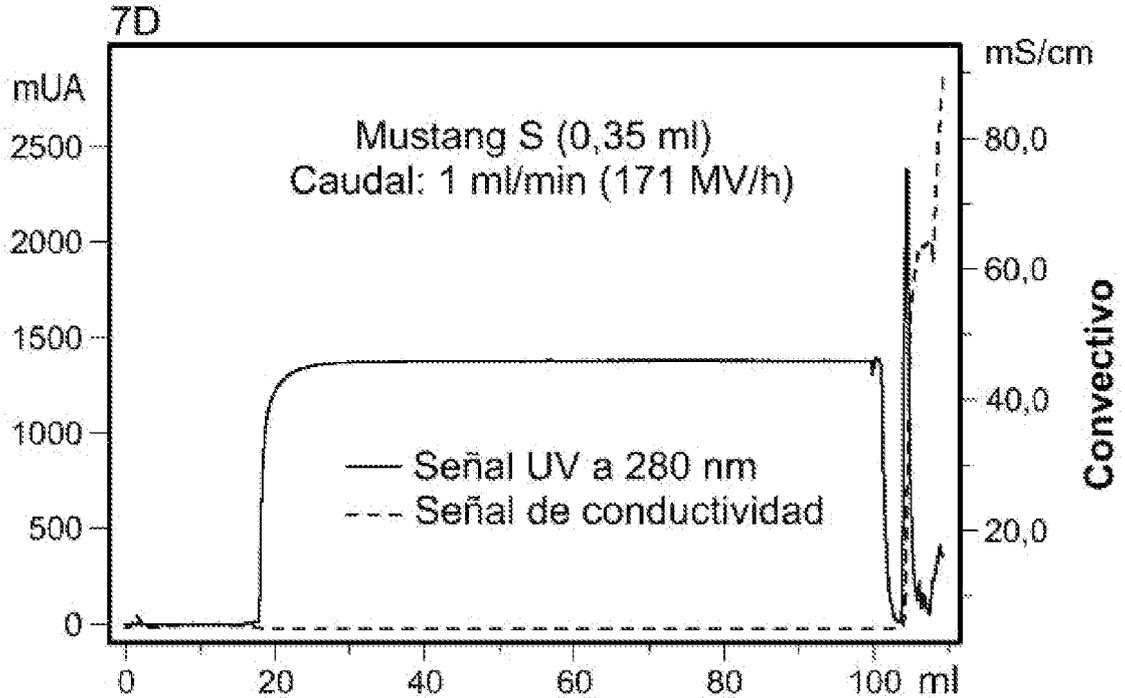
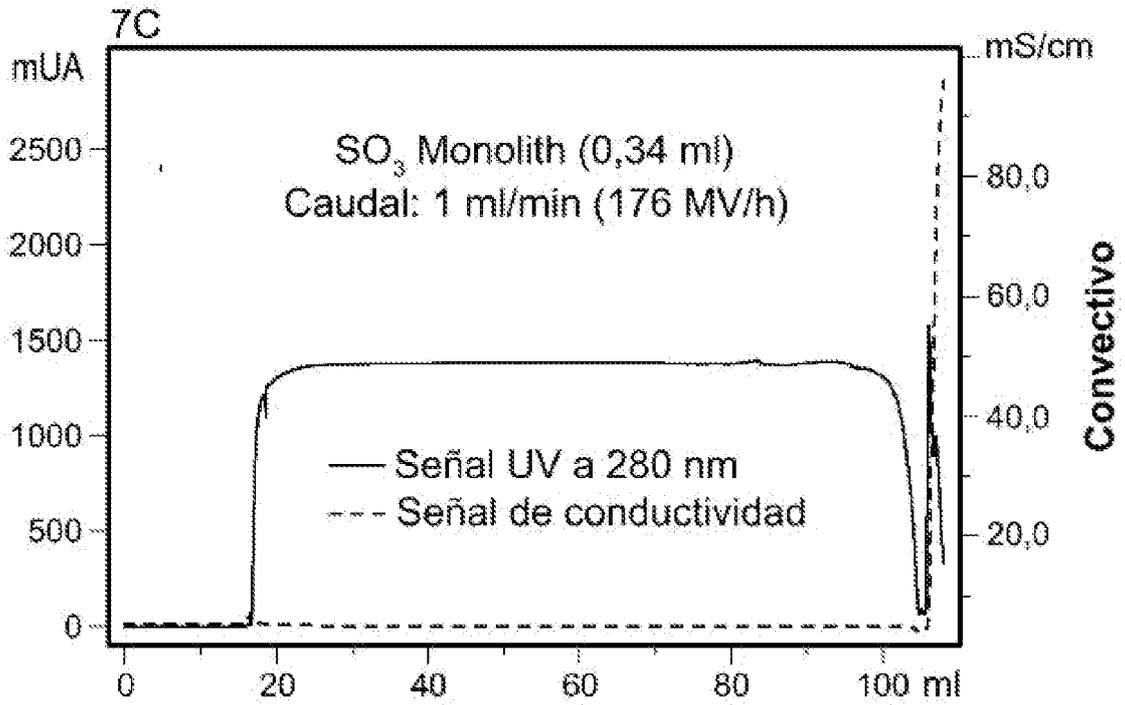


FIG. 7 (Cont.)

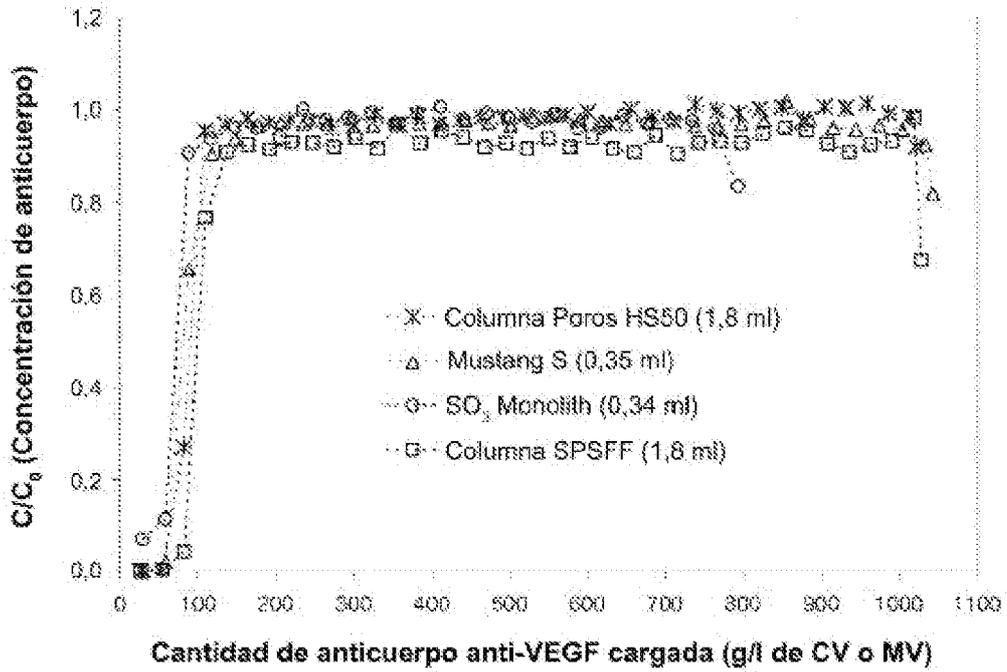


FIG. 8

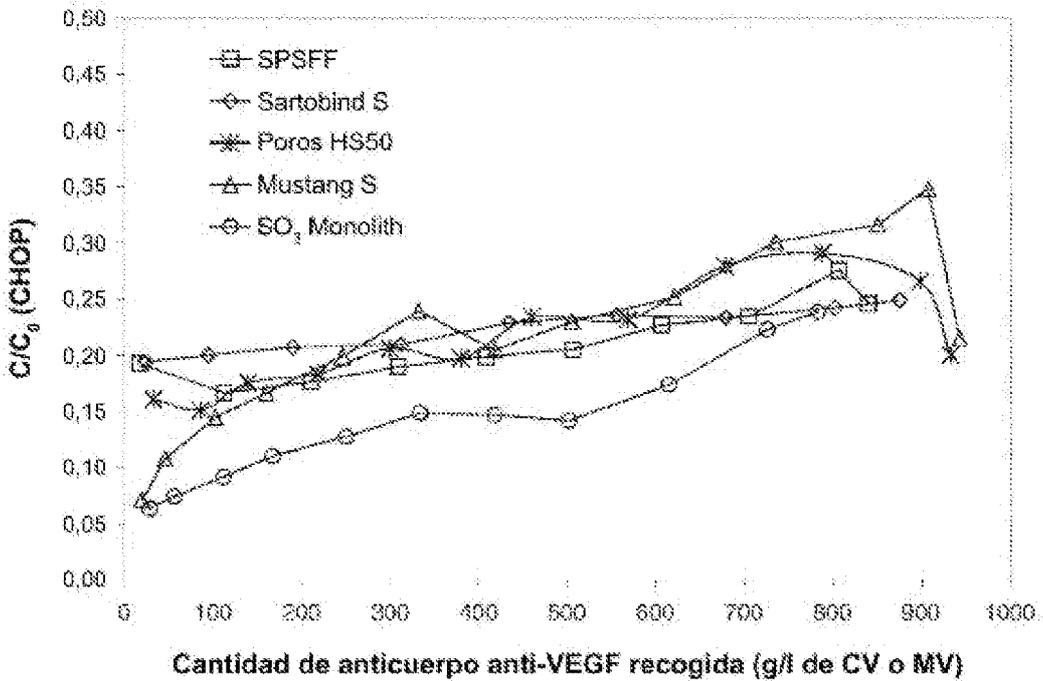


FIG. 9

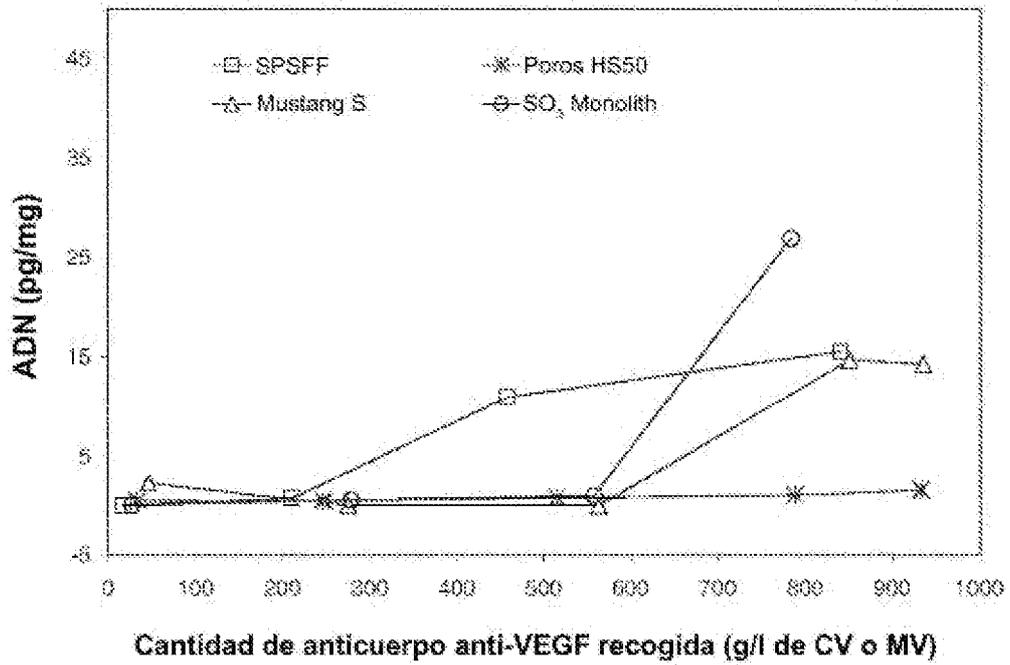


FIG. 10

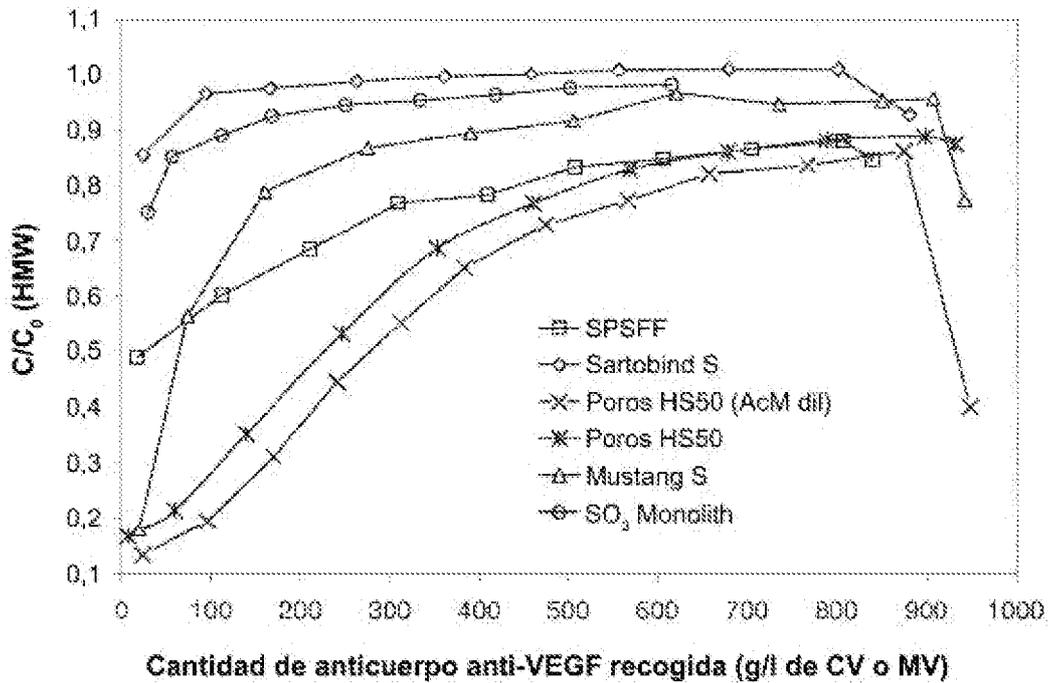


FIG. 11

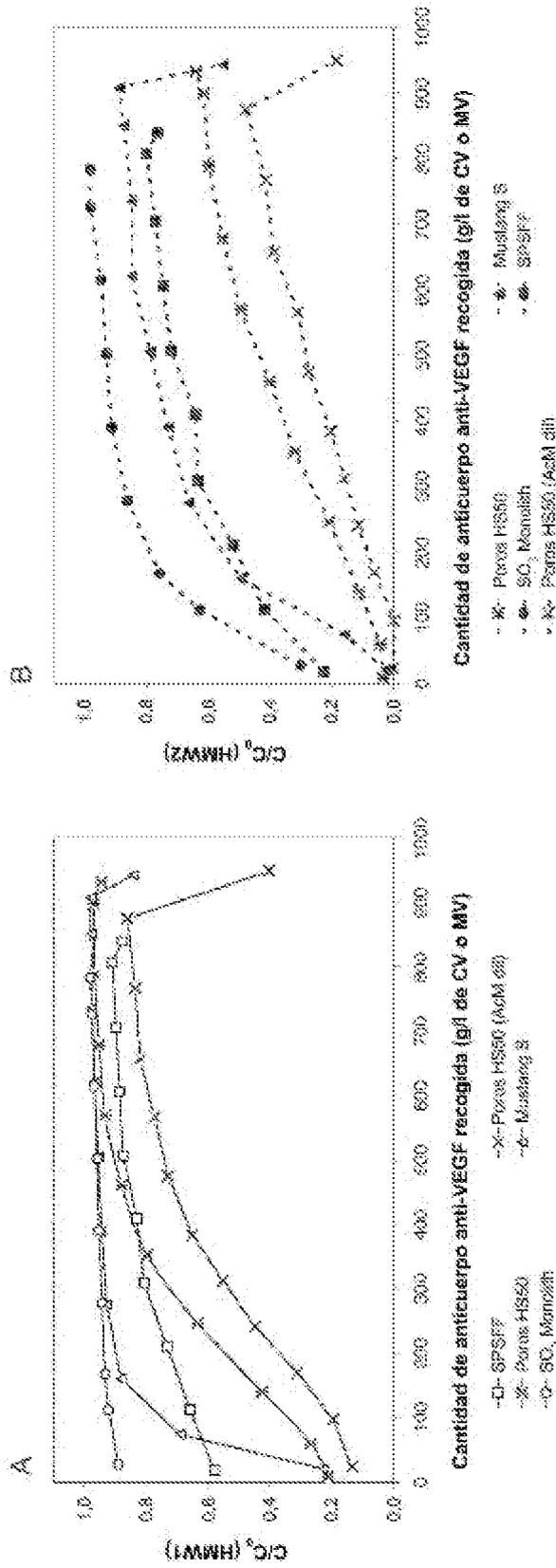


FIG. 12

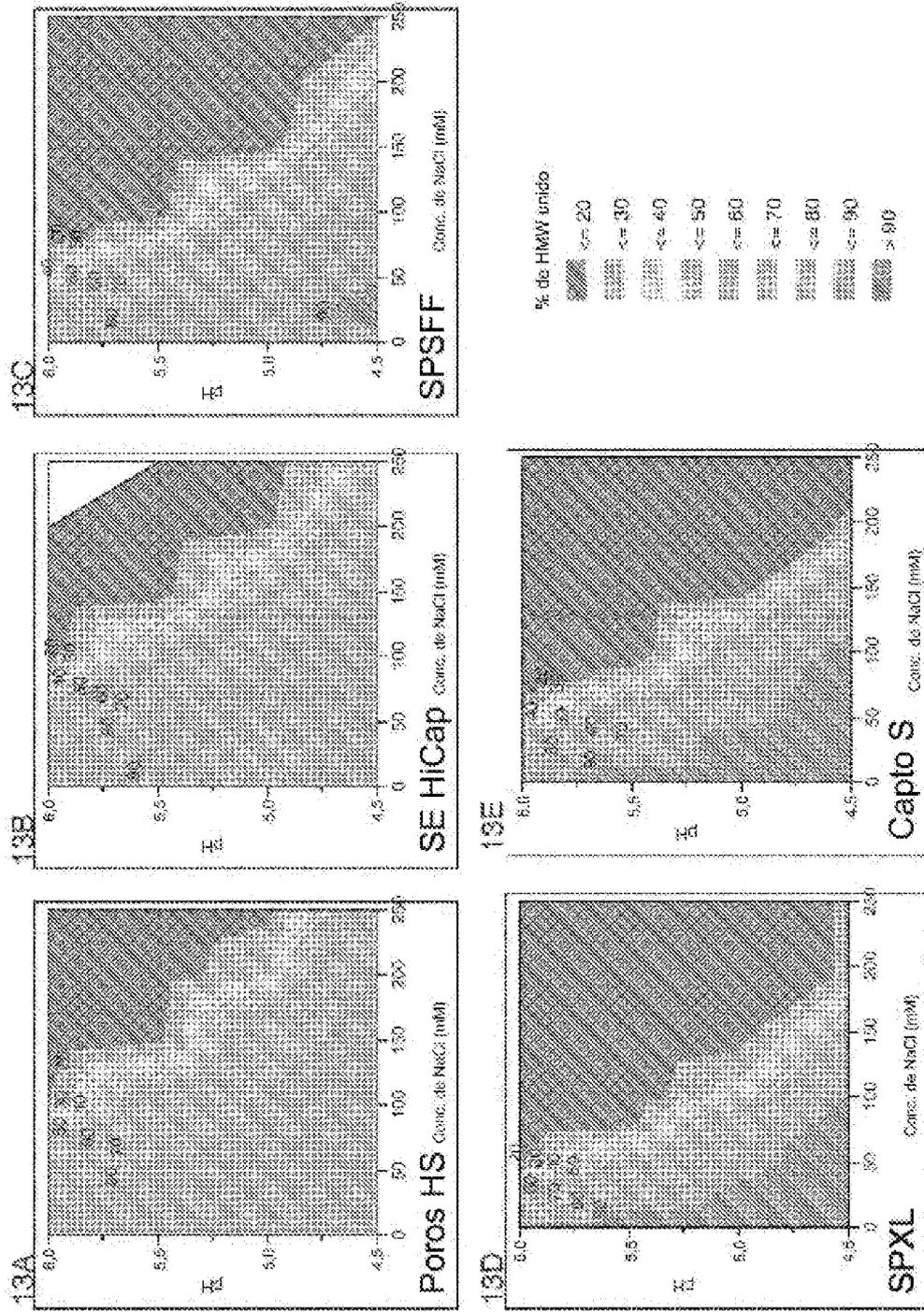


FIG. 13

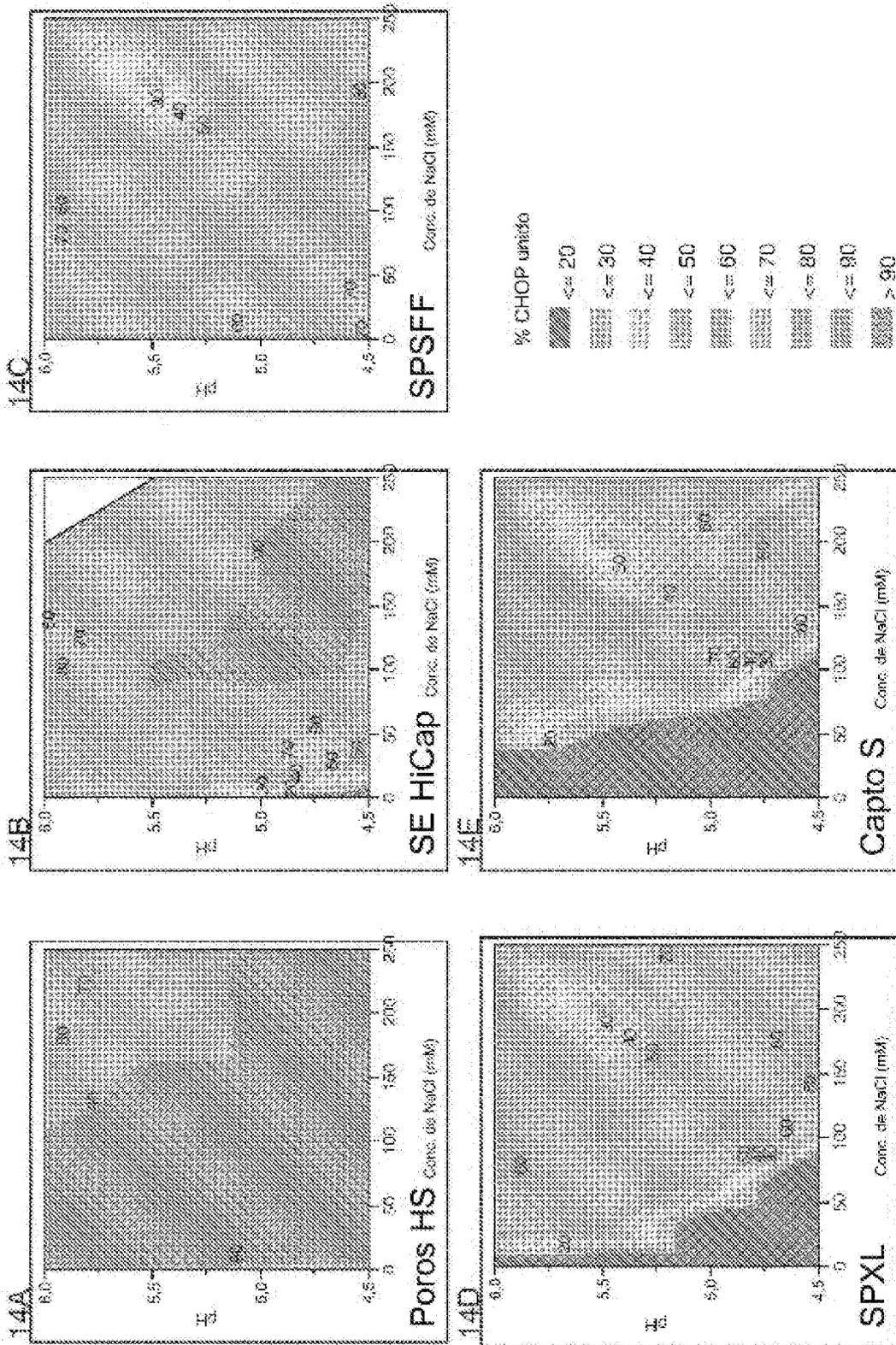


FIG. 14

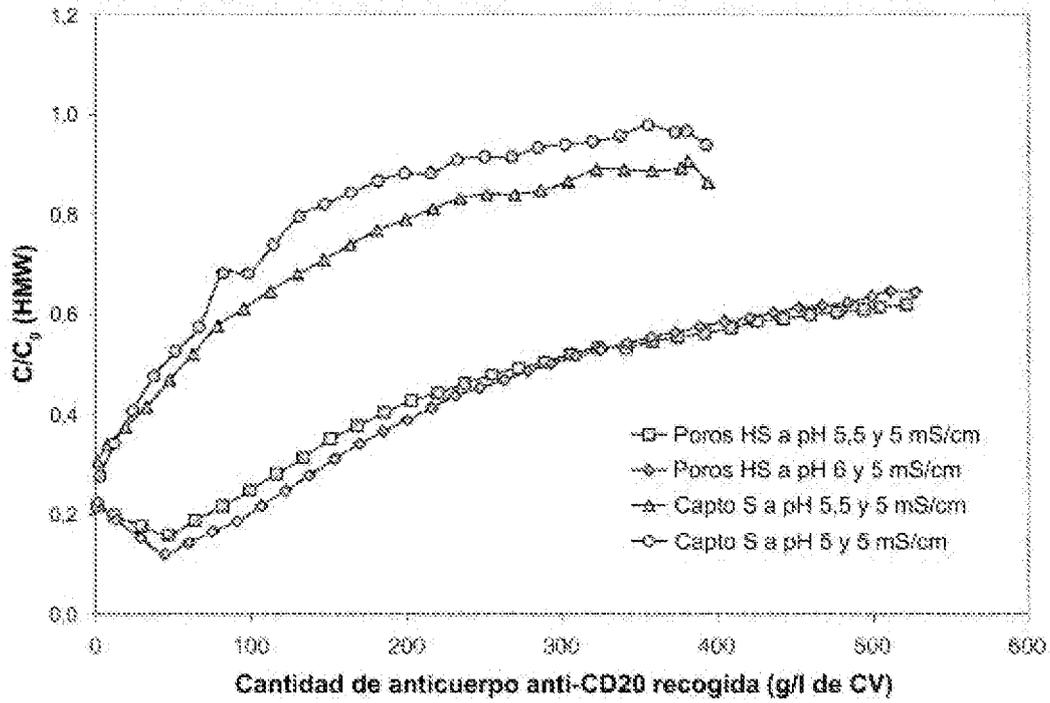


FIG. 15

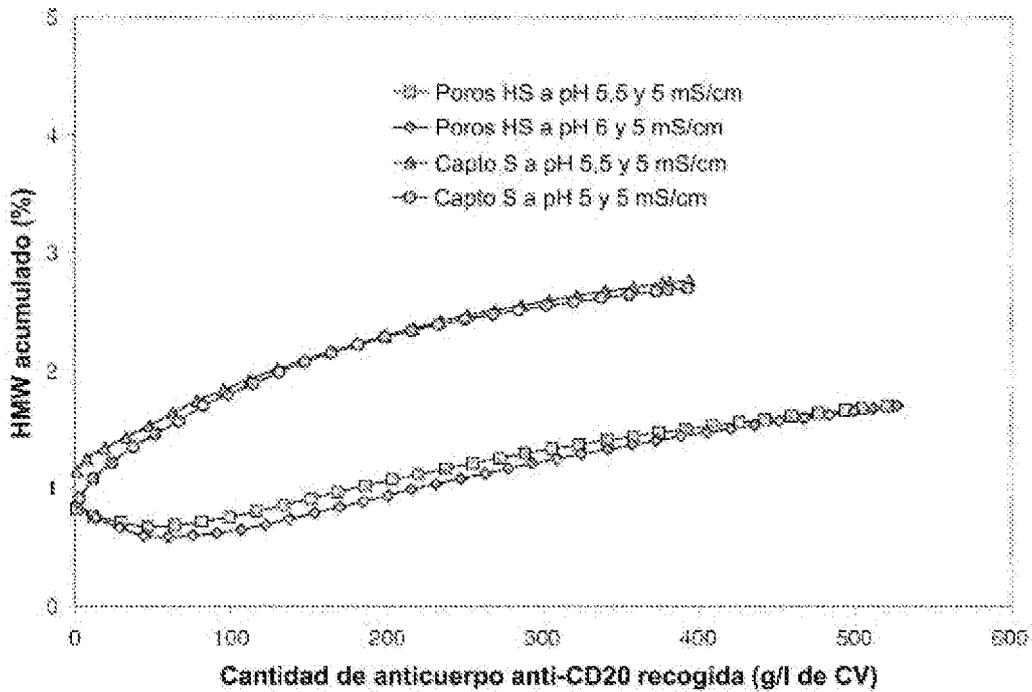


FIG. 16

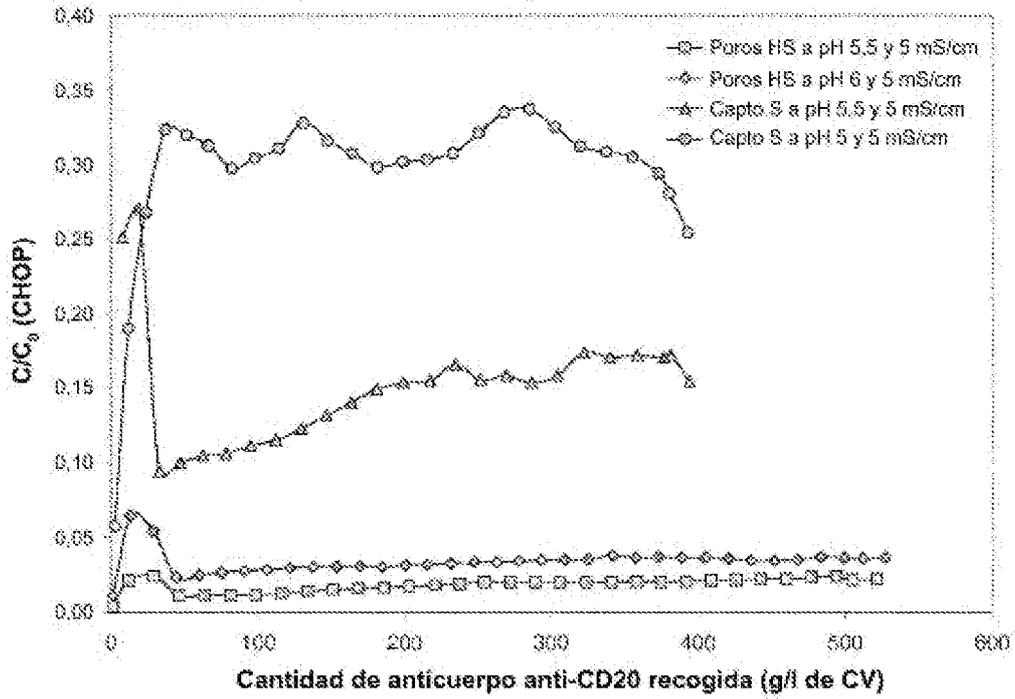


FIG. 17

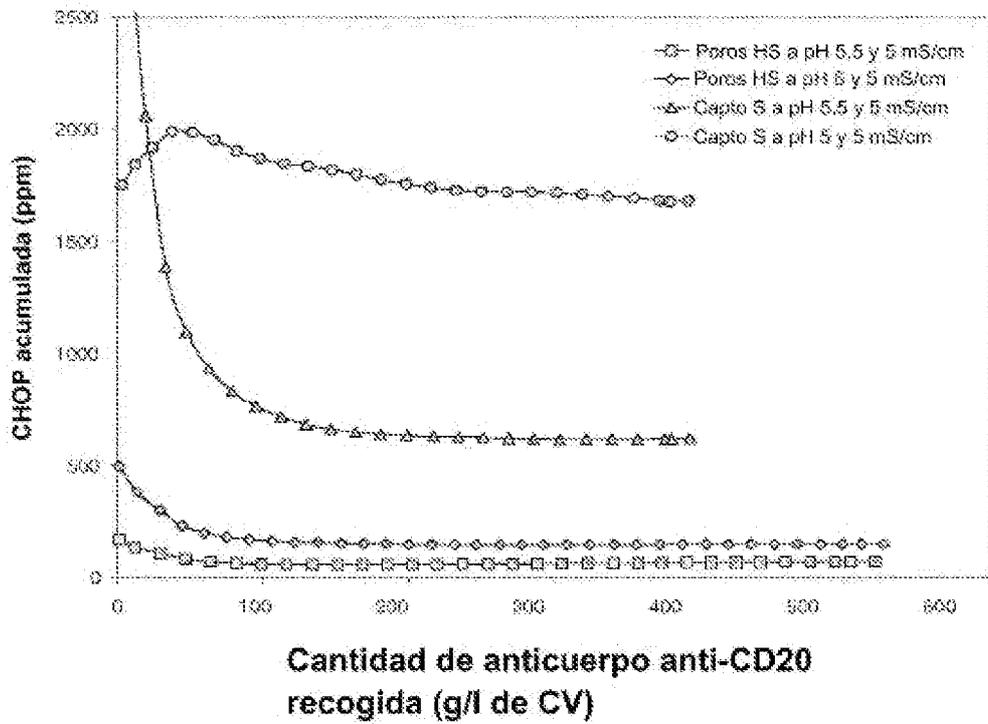


FIG. 18

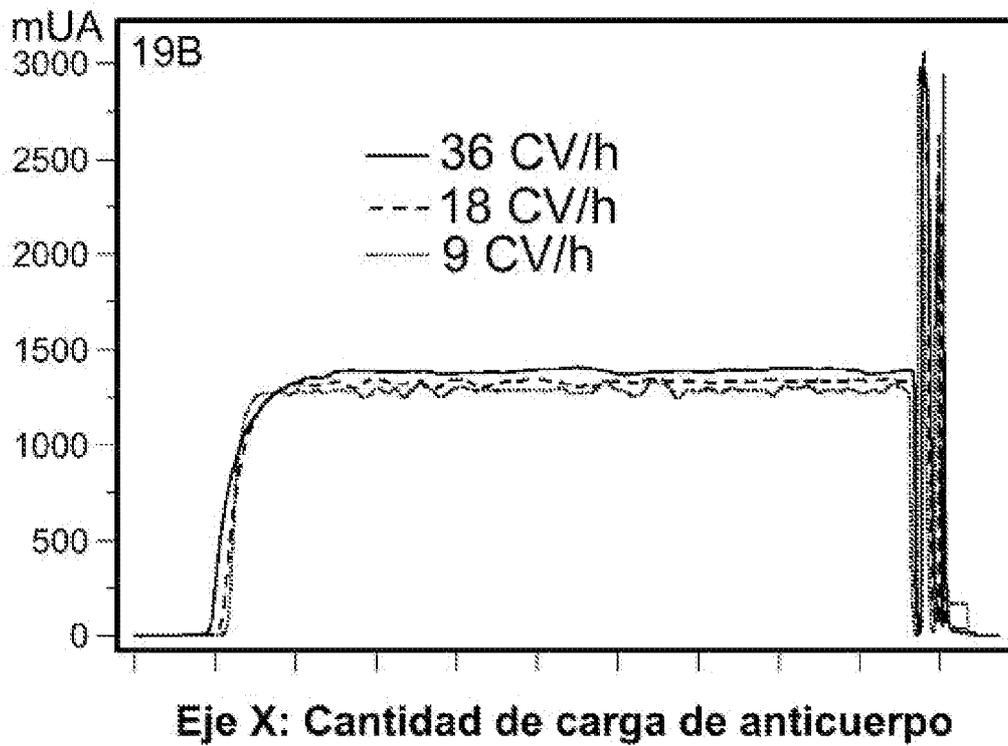
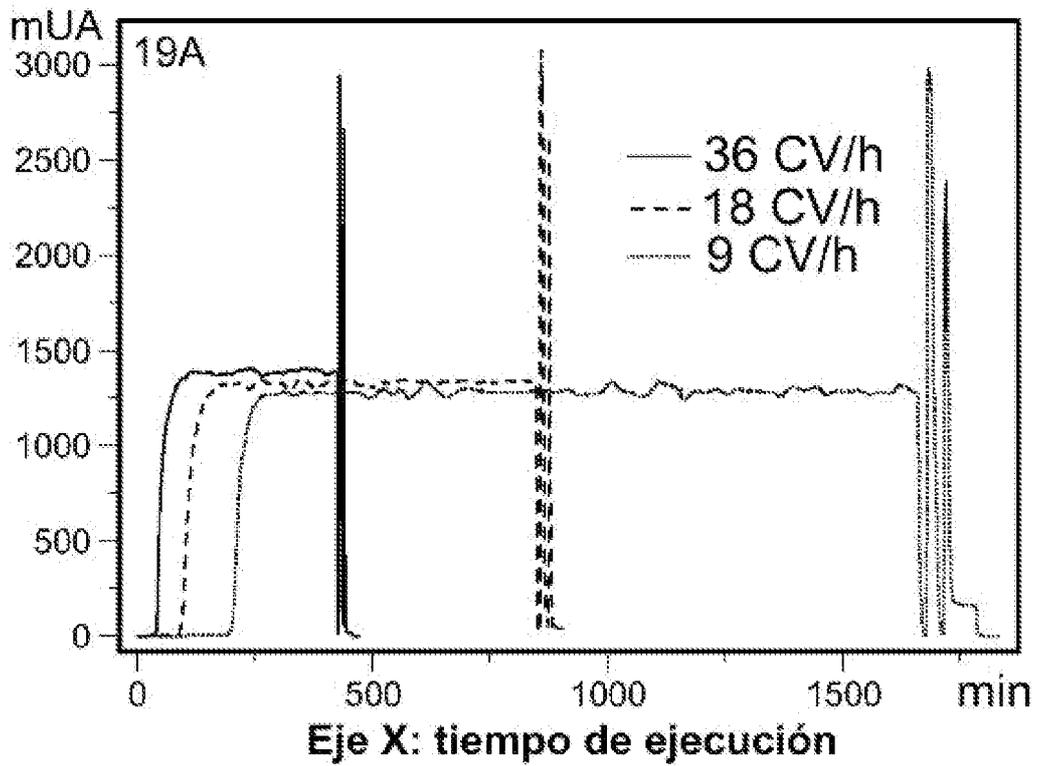


FIG. 19

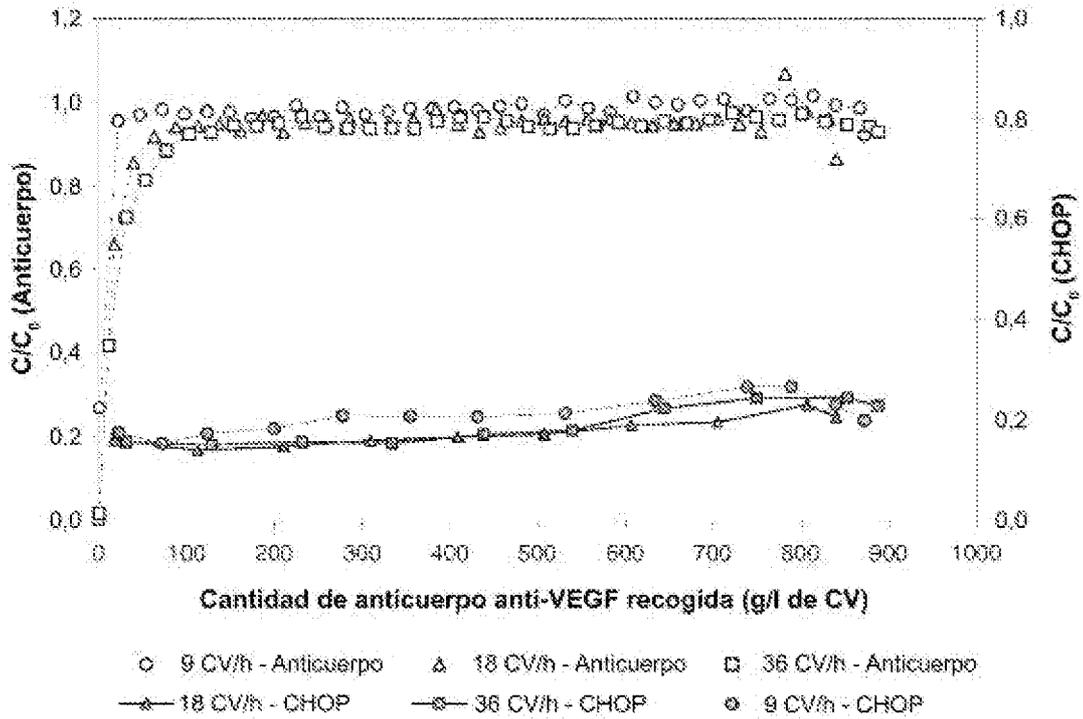


FIG. 20

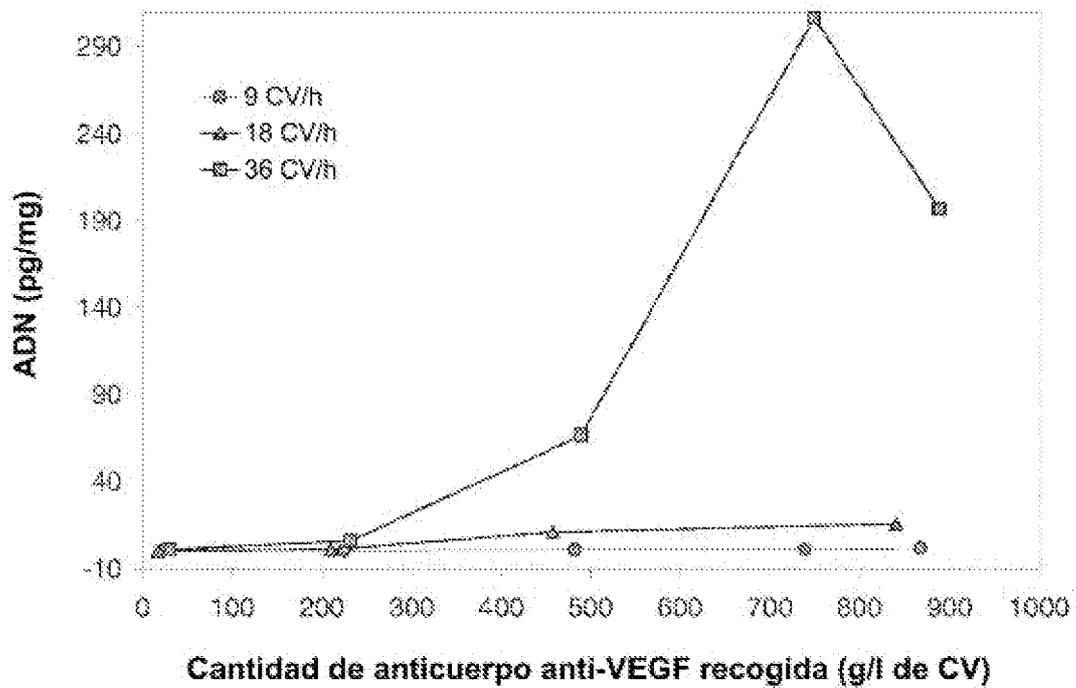


FIG. 21

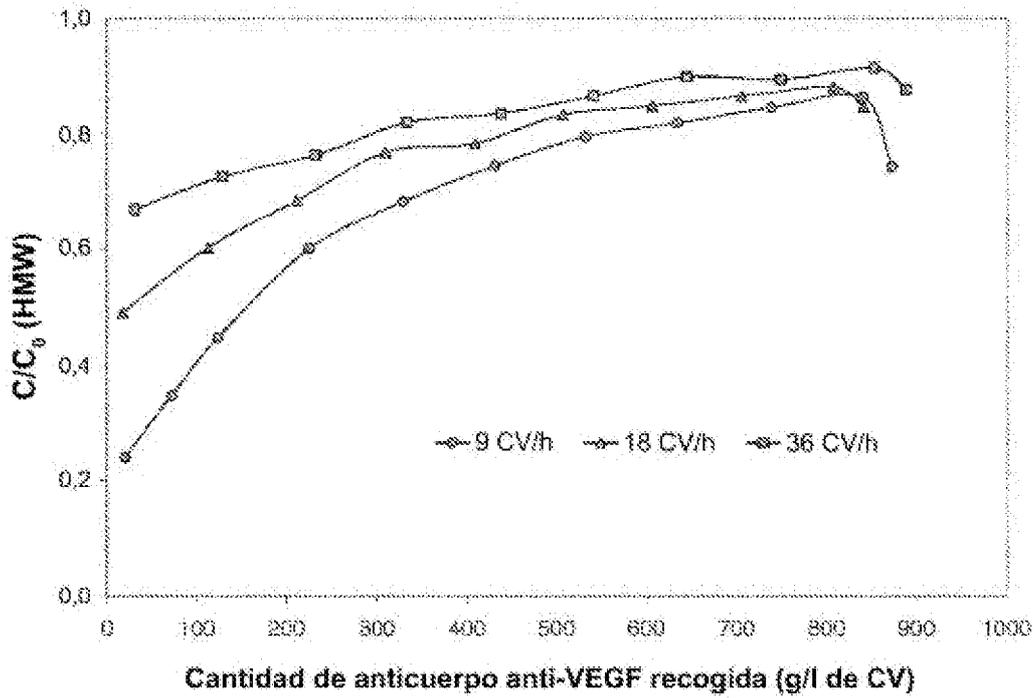


FIG. 22

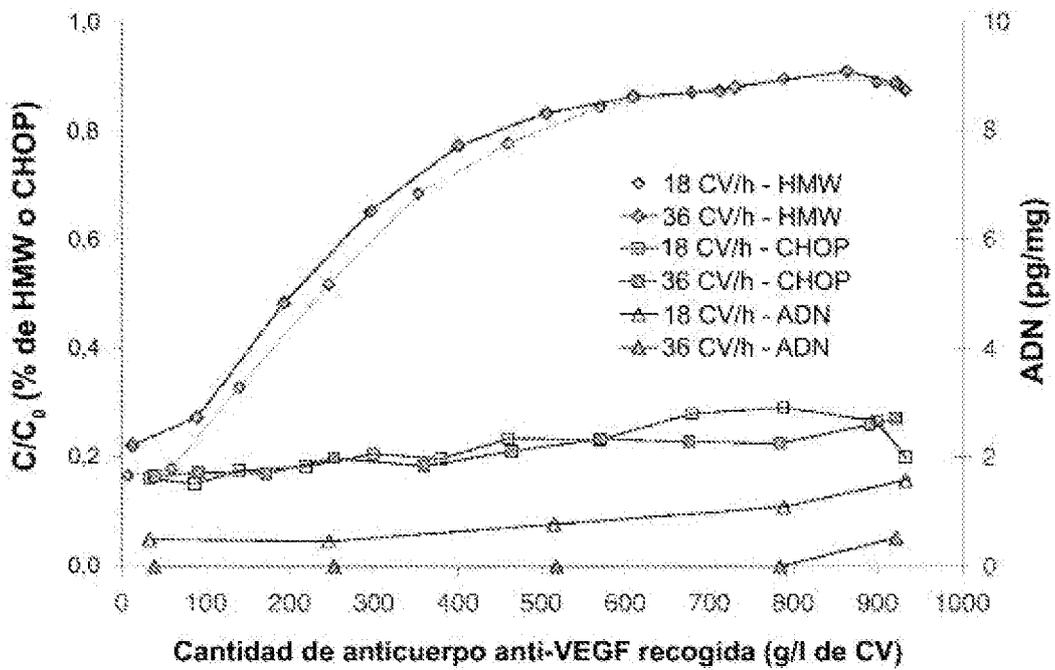
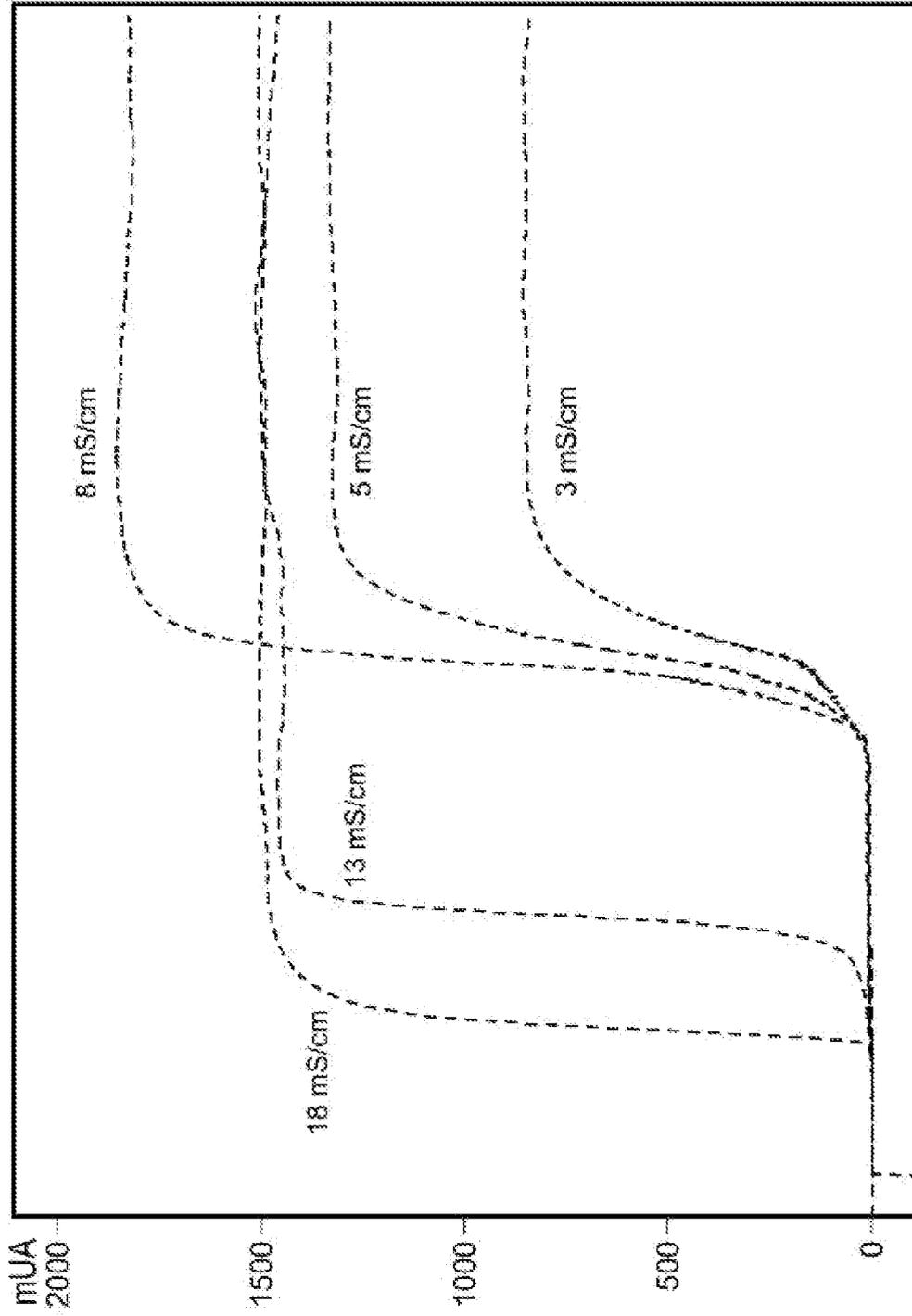


FIG. 23



Normalizado a la cantidad de carga de anticuerpo anti-VEGF

FIG. 24

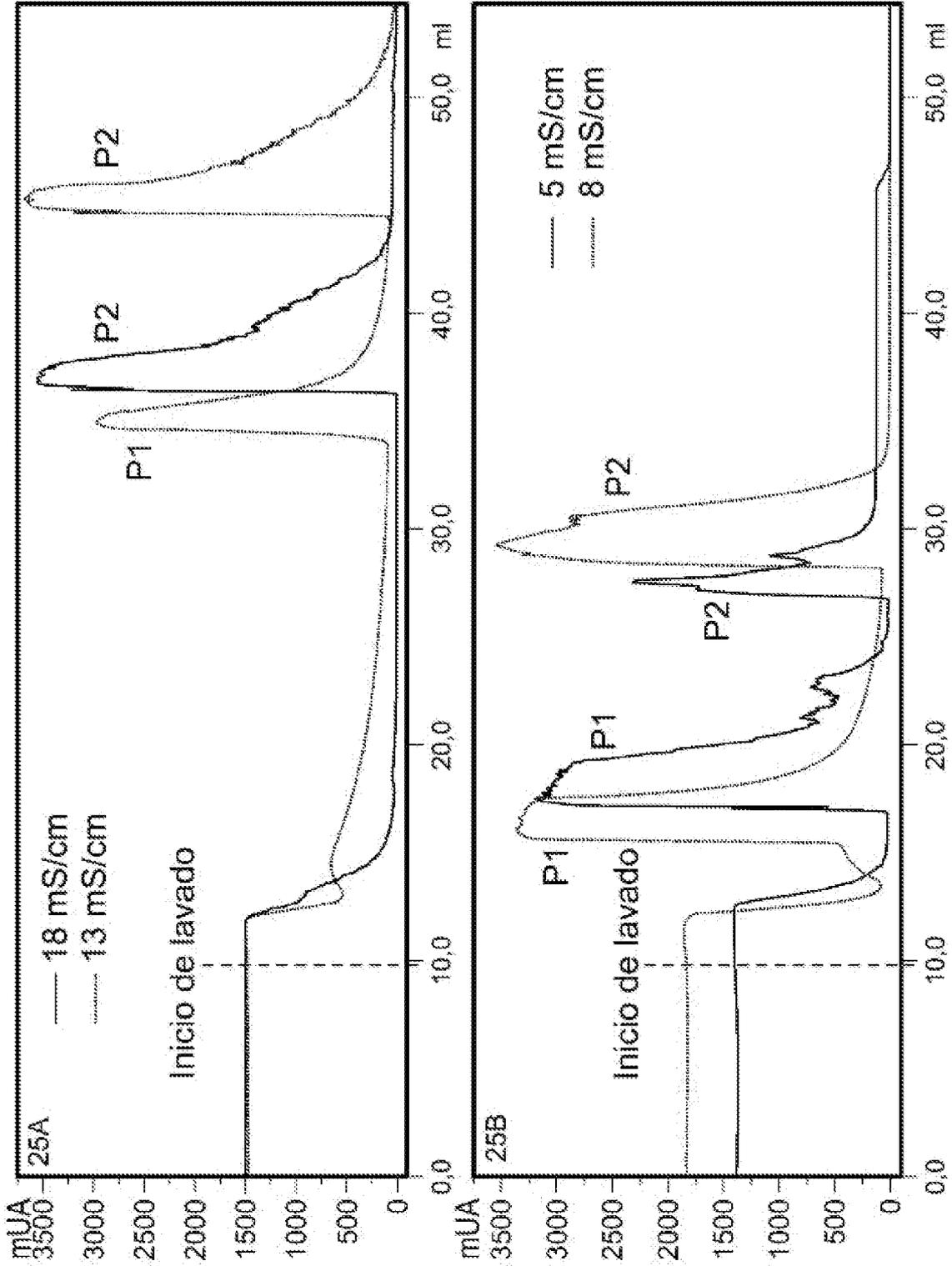


FIG. 25

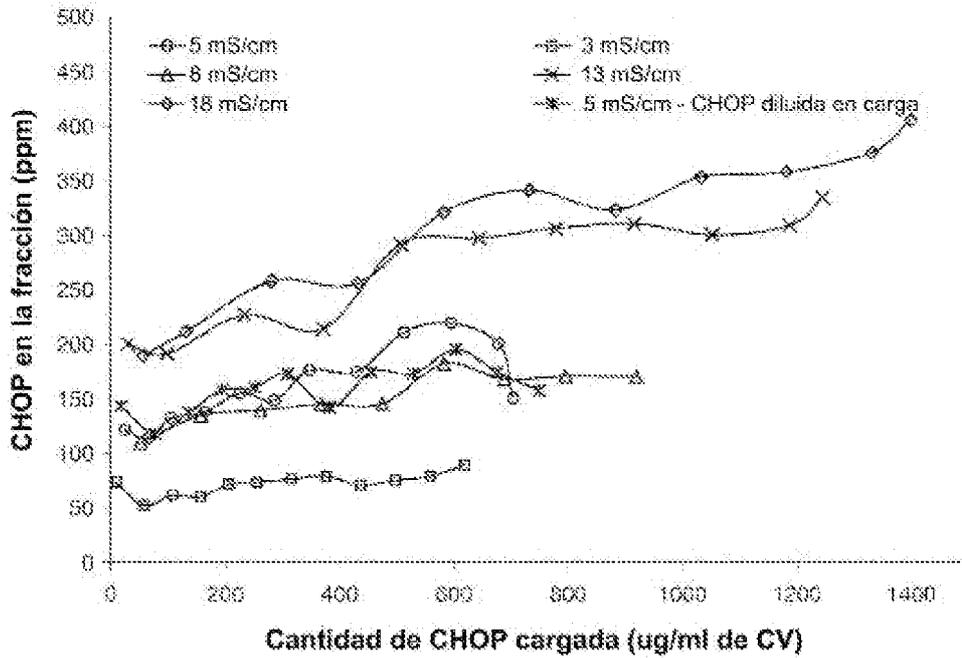


FIG. 26

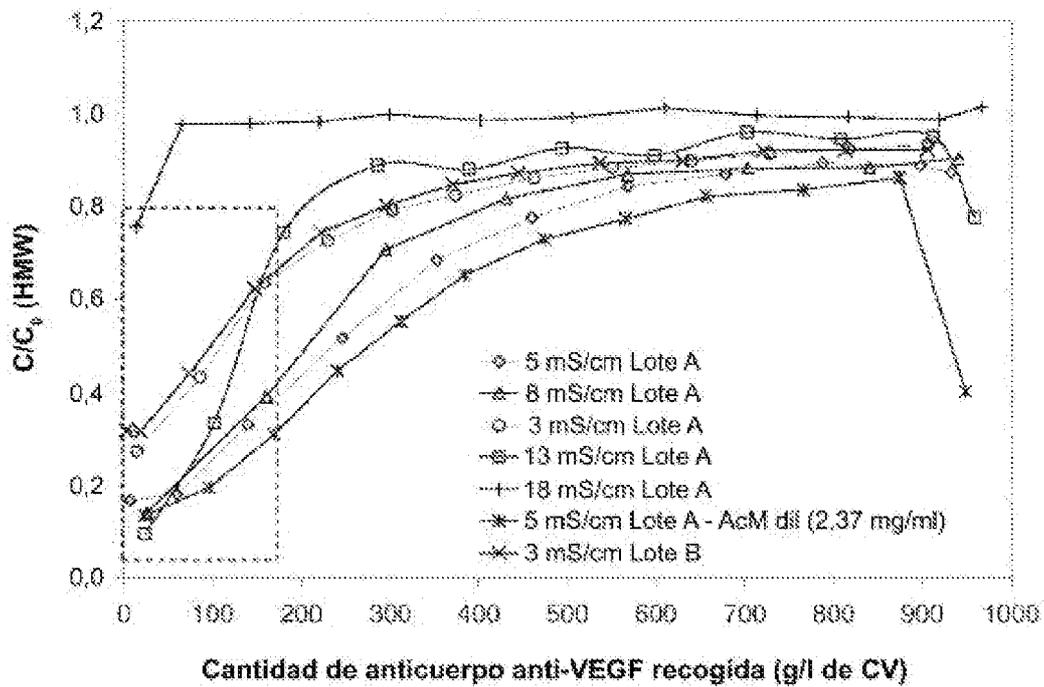


FIG. 27

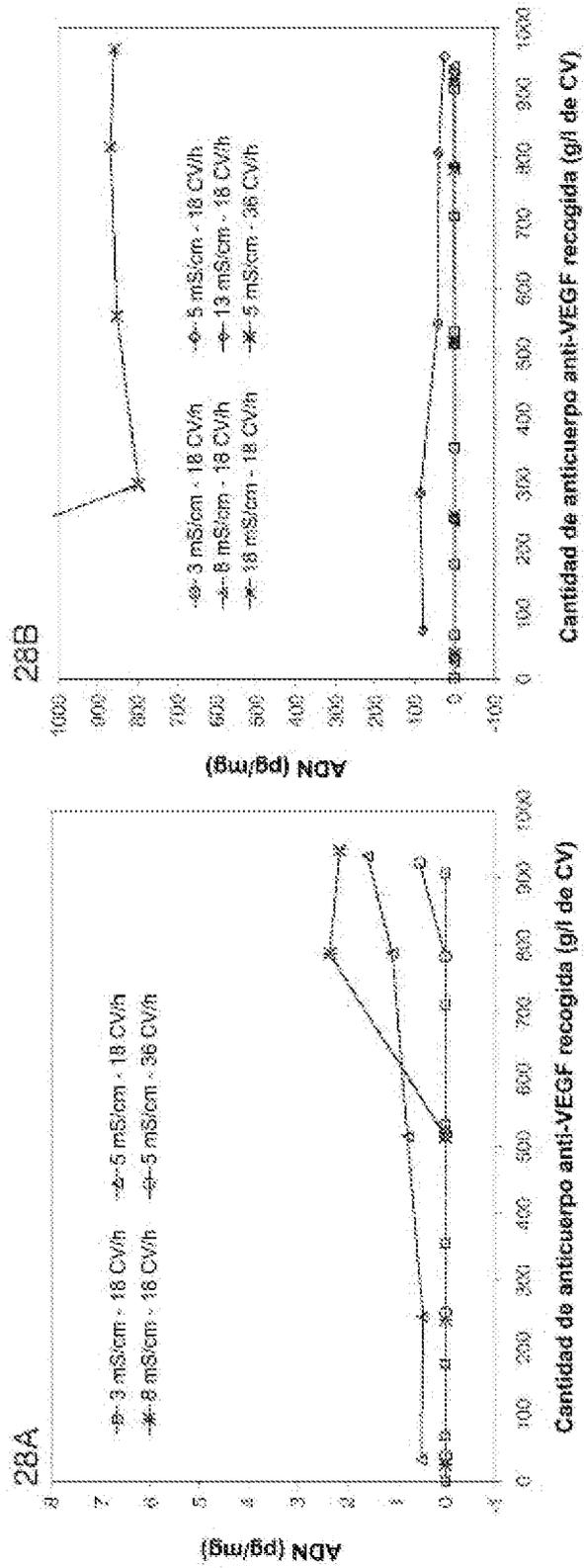


FIG. 28

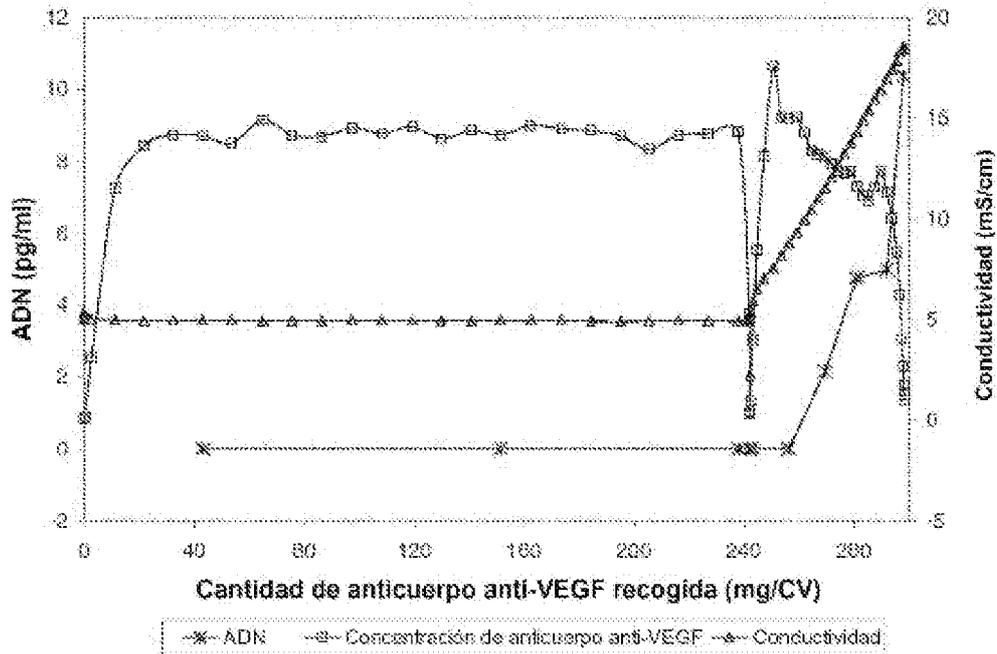


FIG. 29

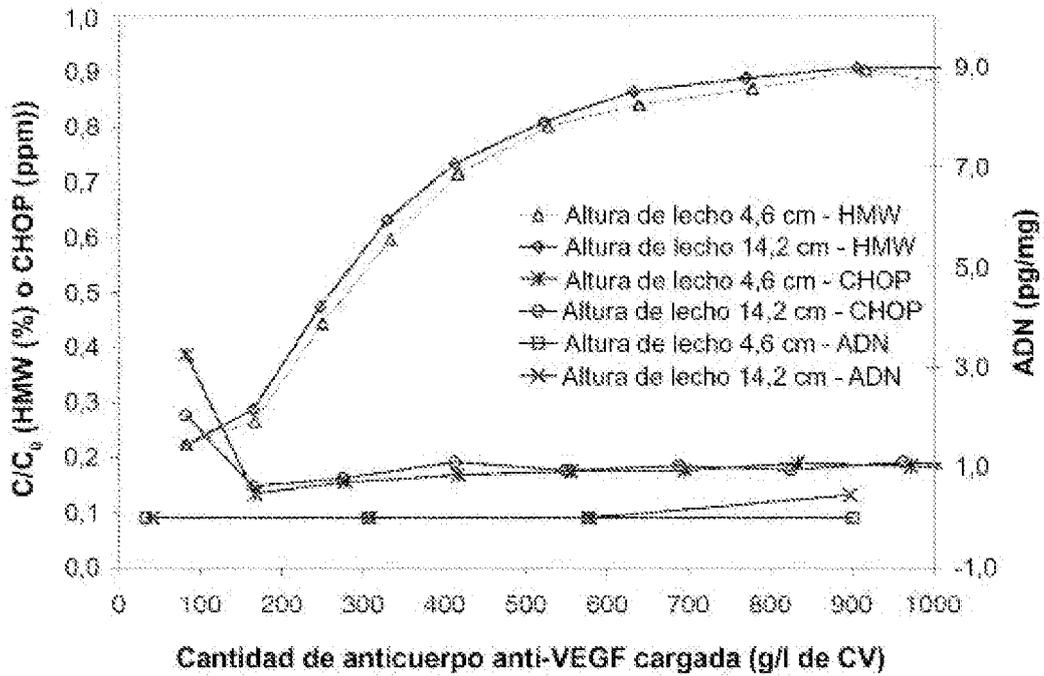


FIG. 30

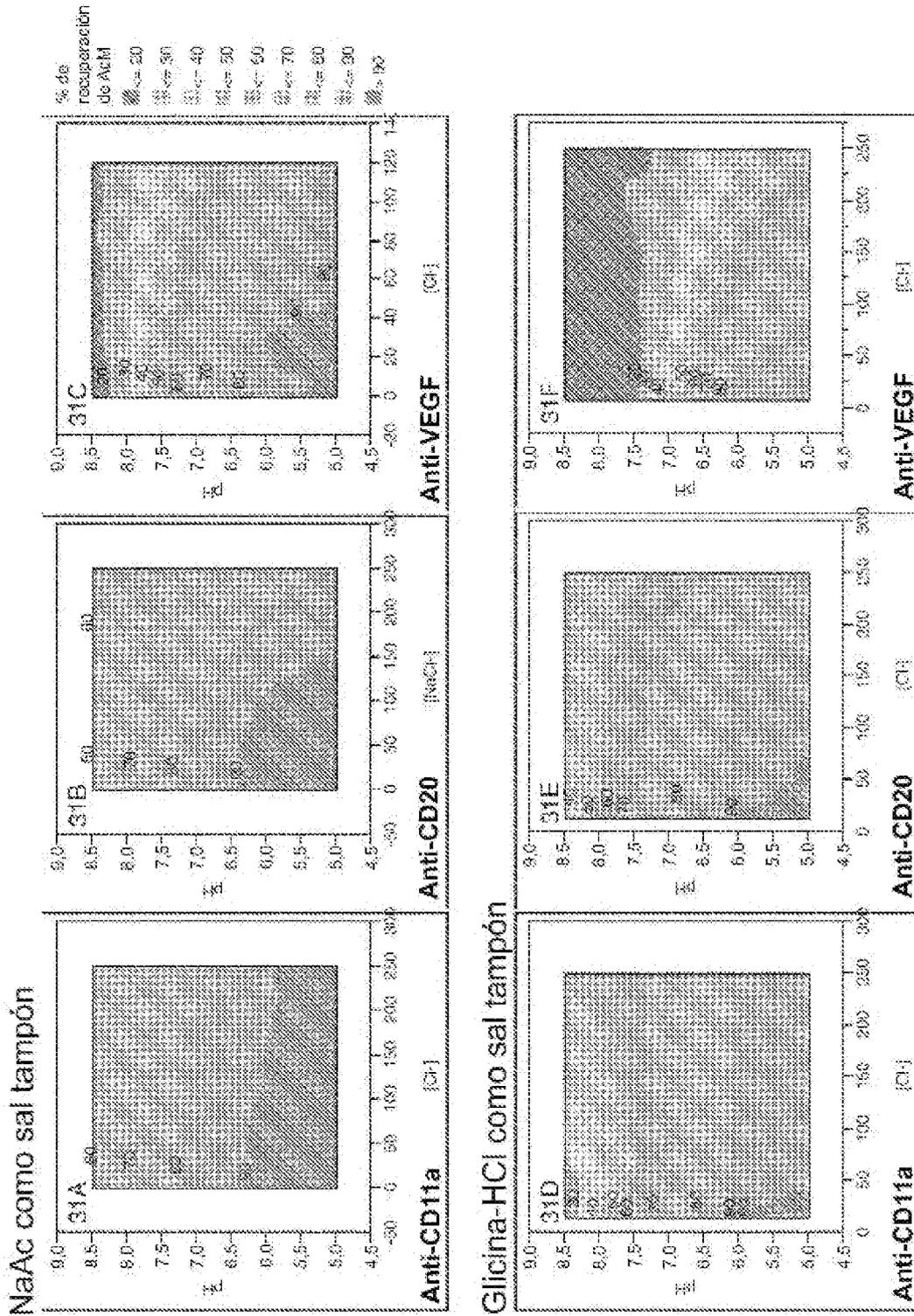


FIG. 31

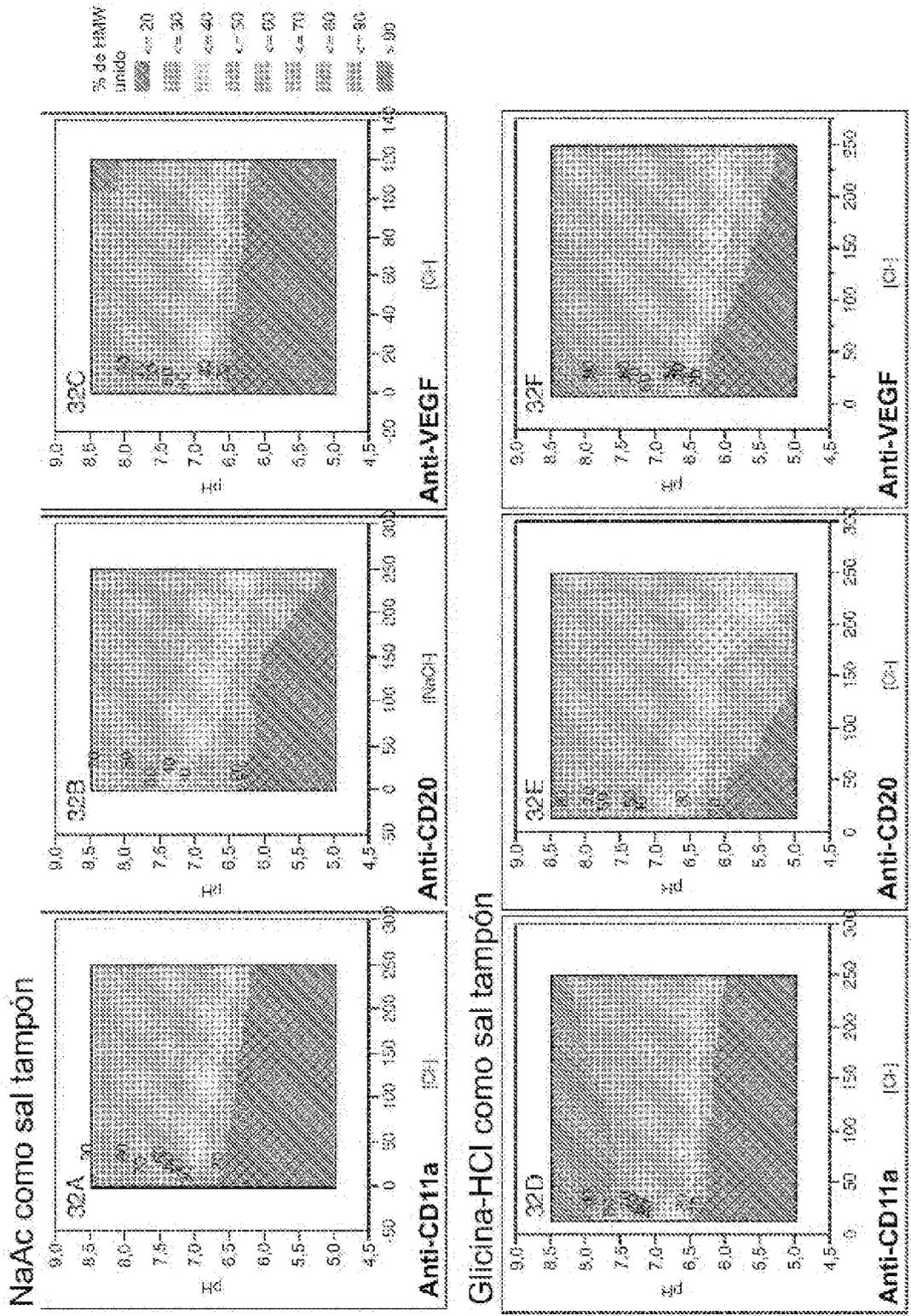


FIG. 32

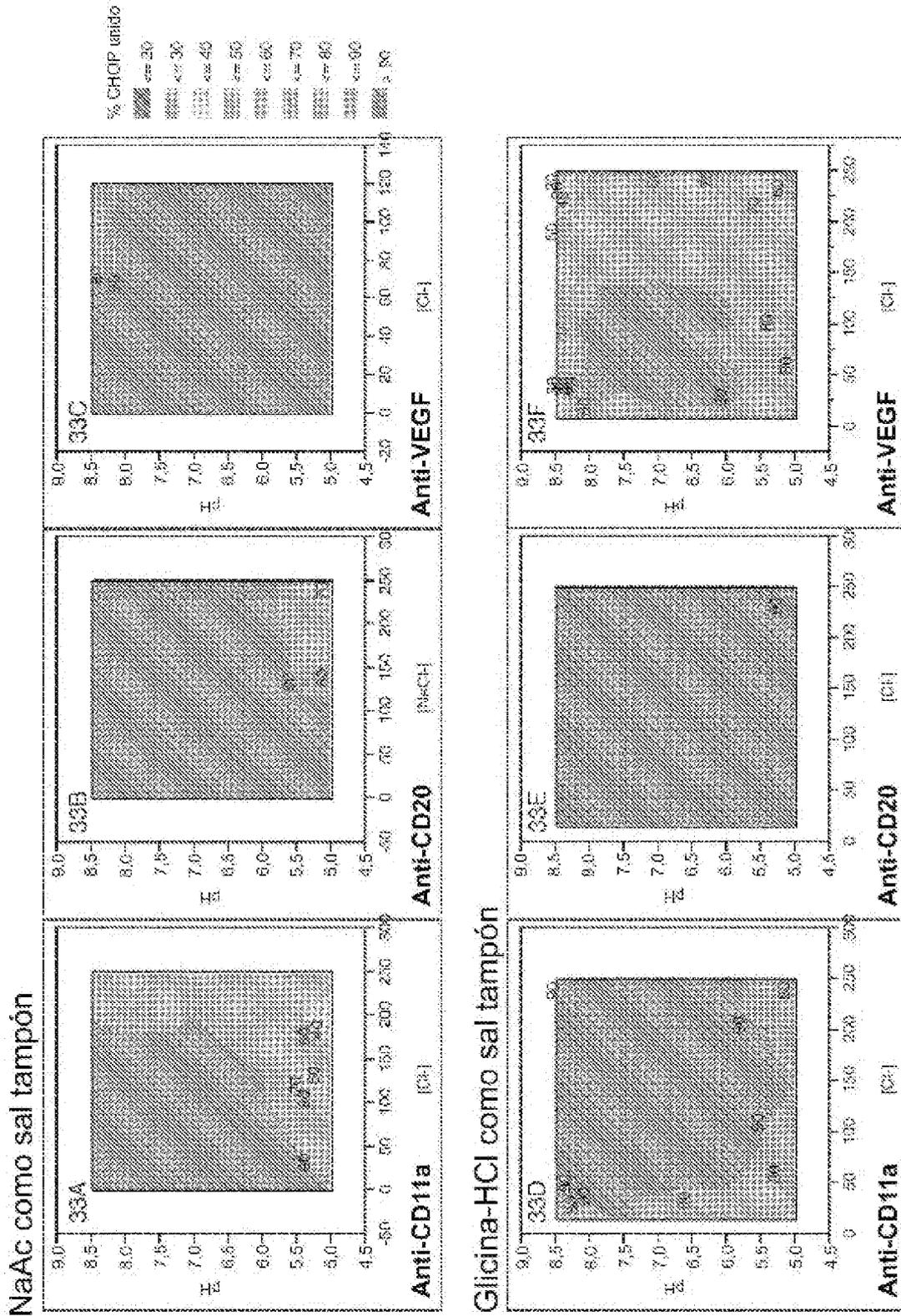


FIG. 33

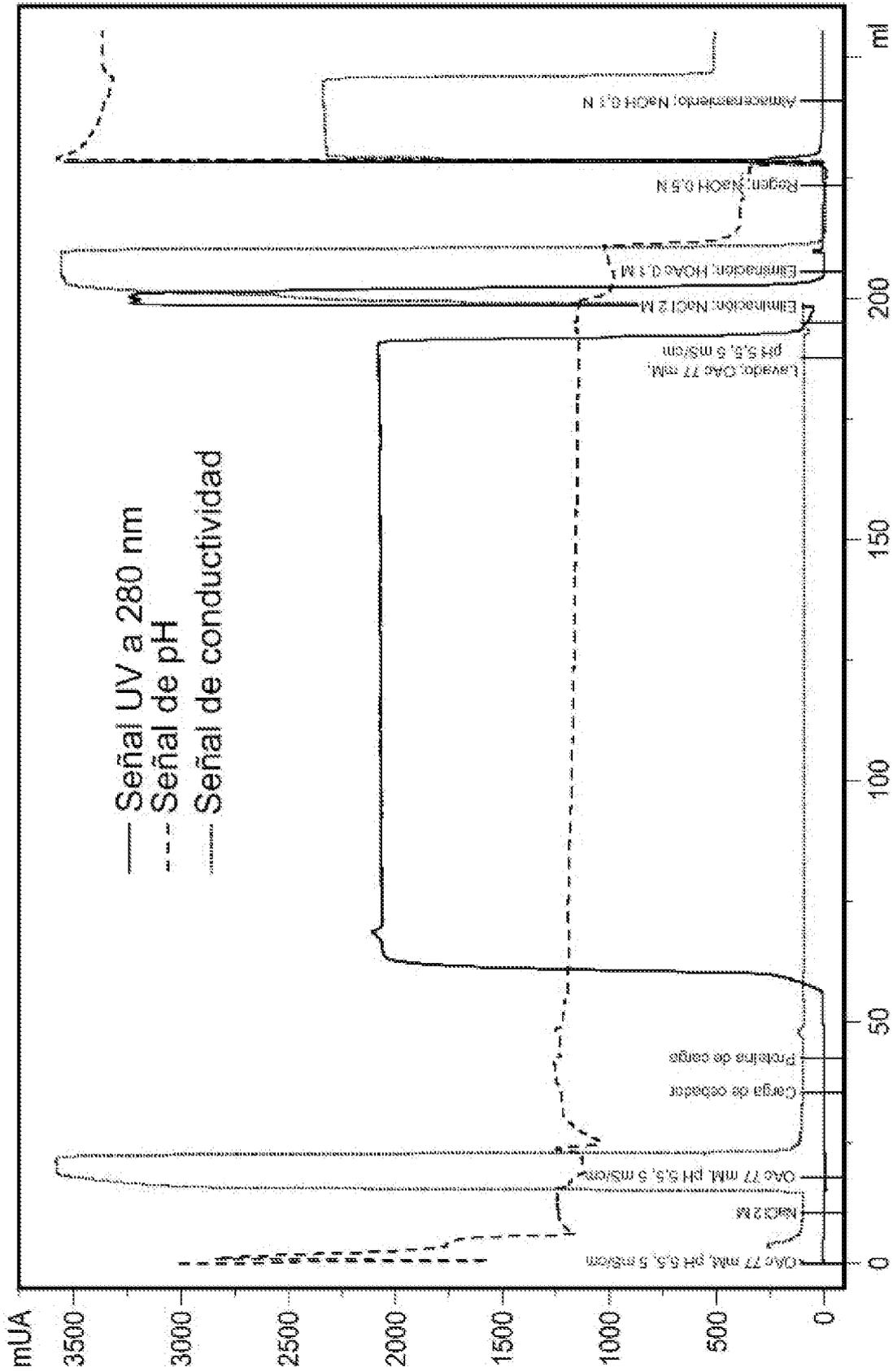


FIG. 34