

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.08.92.

③③ Priorité : 17.10.90 GB 9022547.

④③ Date de la mise à disposition du public de la demande : 24.12.92 Bulletin 92/52.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés : Division demandée le 13.8.92 issue de la demande 91 12738 bénéficiant de la date de dépôt du 16.10.81 de la demande initiale no 000 (art. 14 de la loi du 2.1.68 modifiée)

⑦① Demandeur(s) : *Société dite: THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED Société de droit britannique — GB.*

⑦② Inventeur(s) : Ramage Paul Ian Nicholas et Allen Geoffrey.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Armengaud Jeune Cabinet Lapeudry.

⑤④ Immunoglobuline purifiée.

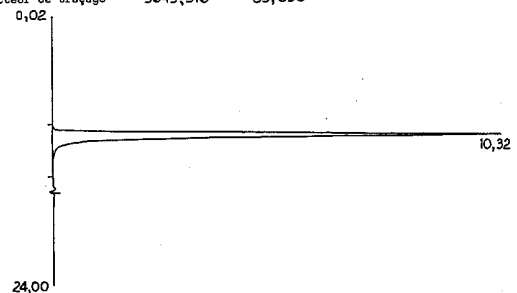
⑤⑦ L'invention concerne l'industrie pharmaceutique. Elle a pour objet une préparation purifiée d'un anticorps recombinant qui présente à la chromatographie d'exclusion dimensionnelle un pic unique en conditions non réductrices (Fig. 5) et deux pics majeurs en conditions réductrices et qui présente de préférence aussi en SDS-PAGE classique une bande principale pour un échantillon non réduit et deux bandes principales pour un échantillon réduit. La préparation présente à la HPLC avec inversion de phase un pic aigu unique en conditions non réductrices et deux pics majeurs en conditions réductrices.

Cette préparation est préférée pour exercer une immunosuppression prophylactique ou thérapeutique.

Exclusion dimensionnelle/non réduit

Analyse G.1W	1345 200690	13:45 20/ 6/90				
Echantillon D203						
Méthode : CPH SEC	G-DEV 95	Data 454				
Temps de rétention	Pic HT	Pic de surface	Surface %	N° de pic	Pic début	Pic fin
10,32	264,03	7385,00D	100,000	1	9,42B	14,13BD
		7385,00				

Analyse G.1W
Echantillon D203
Facteur de traçage



FR 2 677 997 - A1



Immunoglobuline purifiée.

La présente invention concerne une préparation purifiée d'anticorps monoclonaux recombinants leur utilisation en thérapeutique et des procédés pour les produire.

5 Les anticorps ou immunoglobulines sont des molécules protéiques bifonctionnelles, dont une région, qui est hautement variable entre les différents anticorps, est responsable de la liaison avec un antigène, par exemple de nombreux agents infectieux différents que le corps peut
10 rencontrer, tandis que la seconde région, qui est constante, est responsable de la liaison avec les récepteurs Fc des cellules et active aussi le complément. De cette façon, les anticorps constituent un composant vital de la réponse immunitaire des mammifères dans la destruction des
15 micro-organismes et virus étrangers. L'immunisation d'un animal à l'aide d'un antigène se traduit par la production d'anticorps polyclonaux, en d'autres termes, d'anticorps différents ayant des spécificités et affinités différentes. Pour des applications thérapeutiques, il est avantageux
20 d'être à même de produire des anticorps à partir d'un clone lymphocytaire unique; ces anticorps sont appelés anticorps monoclonaux et sont spécifiques pour un déterminant particulier de l'antigène d'origine. Ils peuvent être obtenus par le procédé de Kohler et Milstein (Nature, 1975,
25 256, 495-497).

Une molécule d'anticorps unique de la classe IgG est formée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes qui sont maintenues ensemble par des ponts disulfure intercaténaires. Chaque chaîne légère est unie à une chaîne
30 lourde par une liaison disulfure et les deux chaînes lourdes sont liées l'une à l'autre par des liaisons disulfure. Chaque chaîne lourde comprend à une extrémité un domaine variable suivi d'un certain nombre de domaines constants et chaque chaîne légère comprend un domaine variable à une
35 extrémité et un domaine constant à l'autre extrémité. Le

domaine variable de la chaîne légère est aligné sur le domaine variable de la chaîne lourde. Le domaine constant de la chaîne légère est aligné sur le premier domaine constant de la chaîne lourde. Les domaines constants restants des chaînes lourdes sont alignés les uns sur les autres et forment le fragment Fc après coupure limitée de la chaîne polypeptidique.

Les domaines variables de chaque paire de chaînes légère et lourde forment le site de liaison de l'antigène. Conjointement avec le premier domaine constant de la chaîne lourde et le domaine constant de la chaîne légère, ils forment, après coupure limitée de la chaîne polypeptidique, le fragment Fab. Les domaines variables de chaque paire de chaînes lourde et légère ont la même structure générale, chaque domaine comprenant une charpente de quatre régions, dont les séquences sont relativement conservées, connectées par trois régions déterminantes de complémentarité (CDR), dites aussi hypervariables. Les quatre régions charpente adoptent largement une conformation en feuillet β et les CDR forment des boucles qui connectent la structure en feuillet β et dans certains cas en font partie. Les CDR sont maintenues à proximité étroite par les régions charpente et, avec les CDR de l'autre domaine, contribuent à la formation du site de liaison de l'antigène.

Les anticorps qui sont destinés à la thérapeutique médicale peuvent devoir être administrés à plusieurs reprises, de sorte que la nécessité d'éliminer les immunoglobulines étrangères est importante parce que cette administration peut provoquer une réponse immune et induire la néphrotoxicité, la maladie du sérum et le choc anaphylactique dans les cas graves. Le sérum animal complet ou l'albumine du sérum contiennent d'autres protéines, des lipides et des hydrates de carbone et ces molécules peuvent elles-mêmes susciter une réponse immune, mais exposent au

danger plus grand d'héberger des agents pathogènes tels que celui qui provoque l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE). Des endotoxines indésirables, parce qu'elles produisent des réponses fébriles potentiellement fatales
5 peuvent être présentes aussi.

D'autres contaminants du milieu de culture contenant l'anticorps exprimé sont notamment les acides nucléiques viraux et cellulaires de l'hôte, de même que des agrégats
10 d'anticorps parce qu'ils peuvent aussi agir comme immunogènes et provoquer une réponse immune indésirable.

La présente invention a donc pour objet une préparation purifiée d'un anticorps recombinant qui présente
15

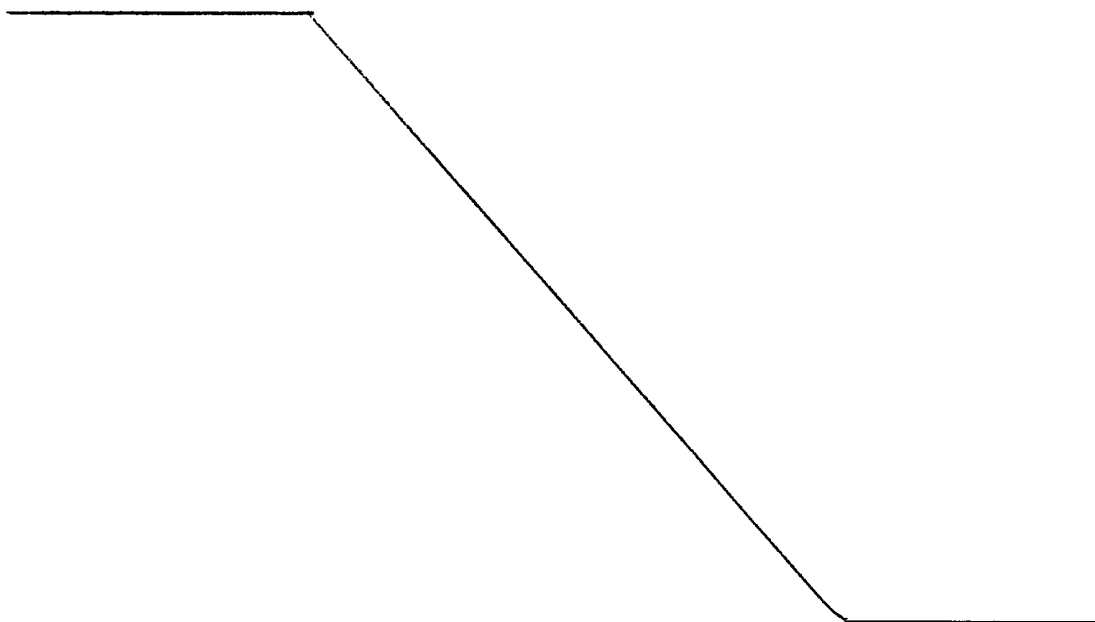
- 1) à la chromatographie d'exclusion dimensionnelle un pic unique dans des conditions non réductrices et deux pics majeurs dans des conditions dénaturantes et réductrices ;
- 20 2) à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS classique une bande principale pour un échantillon non réduit et deux bandes principales pour un échantillon réduit;
- 25 3) à la HPLC avec inversion de phase un pic aigu unique dans des conditions non réductrices et deux pics majeurs dans des conditions réductrices;
- 4) et une activité spécifique supérieure à 0,8 kilo-
30 unité/mg.

La chromatographie d'exclusion dimensionnelle, comme le nom le suggère, opère la séparation sur la base de la dimension des protéines. En règle générale, la séparation a
35 lieu du fait que les grosses molécules sont empêchées d'entrer dans la phase stationnaire poreuse et sont entraînées directement à travers la colonne, tandis que les

molécules progressivement plus petites sont de plus en plus à même de pénétrer dans la phase stationnaire et présentent donc des temps d'élution particulièrement plus longs. C'est la porosité de la phase stationnaire qui détermine donc la
5 séparation réalisée. Cette technique analytique est particulièrement bonne pour la détermination des taux d'agrégats dans la préparation purifiée.

La phase stationnaire est un gel de silice à grand
10 pores qui peut être modifié par des radicaux diol, de préférence un gel tel que le Zorbax GF450-GF250 (marque de commerce de la Société Dupont) ou le gel G3000 SWXL ou G4000 SWXL TSK.

15 La phase mobile a généralement un pH de l'intervalle de 4 à 8, de préférence de 6 à 7,5 et avantageusement d'environ 6,8. Cette phase est avantageusement un mélange d'un phosphate, comme l'hydrogène-orthophosphate de disodium, d'un sulfate, comme le sulfate de sodium ou de
20 potassium, et d'eau. La molarité d'un tel mélange est généralement 25mM à 1M, plus avantageusement voisine de 50mM.



L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS PAGE) donne des informations à propos du nombre et du type des protéines contenues dans un mélange et de leur abondance relative et permet une mesure de leurs poids moléculaires. Le SDS est un détergent anionique qui réagit avec les protéines avant l'électrophorèse. La plupart des complexes protéine-SDS sont solubles et migrent dans un gel de polyacrylamide en direction de l'anode sous l'influence d'un champ électrique. La vitesse de migration est généralement en raison inverse du logarithme du poids moléculaire de la protéine. Il est commode d'exécuter l'analyse avec SDS sur un gel à gradient, qui peut être un lit plat ou une plaque ou un bâton vertical. Le gradient est avantageusement de 10 à 22%, de préférence de 8 à 18%. De préférence, le gel est le gel Pharmacia Excel (marque de commerce).

La HPLC avec inversion de phase opère la séparation sur la base du caractère hydrophobe. Comme dans les autres techniques HPLC, il y a une phase stationnaire polymère, par exemple de poly(styrène/divinylbenzène). La phase mobile est habituellement une combinaison d'un tampon aqueux faible ou d'un acide dilué et d'un solvant organique miscible à l'eau. Pour une séparation efficace des protéines, la phase mobile est généralement un système à gradient qui est nécessaire pour opérer la séparation et est de préférence linéaire pour la commodité.

La phase stationnaire pour l'analyse des immunoglobulines peut être une matrice polymère organique, comme le PLRP-S de Polymer Labs, généralement d'une granulométrie voisine de 8 μm ; la dimension des pores est de préférence de 300Å ou 1000Å. La phase mobile est avantageusement un mélange d'un acide, comme l'acide formique, acétique ou trifluoroacétique, d'eau et d'acétonitrile. L'acide et l'eau sont de préférence présents dans le rapport de 5:3.

Un anticorps peut être réduit en ses chaînes lourdes et légères constitutives par réduction des ponts

disulfure dans des conditions dénaturantes, par exemple au moyen de chlorure de guanidinium et de dithiothréitol. L'alcoylation ultérieure des radicaux thiol libres, par exemple par l'iodoacétamide et l'acide iodoacétique, aide
5 à empêcher la reformation des liaisons.

Une mesure de la pureté est donnée par l'activité spécifique de la préparation d'anticorps. L'activité spécifique peut être déterminée par le procédé exposé dans les exemples. Une préparation conforme à l'invention a de
10 préférence une activité spécifique supérieure à 0,8 kilo-unité par mg, idéalement supérieure à 0,9 kilo-unité par mg et plus avantageusement voisine de 1,0 kilo-unité par mg.

Une préparation purifiée d'un anticorps
15 conforme à l'invention est idéalement une substance exempte de contaminants cellulaires de l'hôte, comme des protéines, acides nucléiques et endotoxines cellulaires de l'hôte. L'activité spécifique procure une information à propos des taux de protéines cellulaires de
20 l'hôte dans la préparation. Les taux d'endotoxines peuvent être mesurés par le procédé LAL (lysate d'amibocytes de limule) décrit dans Parenteral Quality Control, M. J. Alles et al, Marcel Dekker Inc, New York.

Une préparation conforme à l'invention est aussi
25 en substance exempte d'agrégats, tels que déterminés par chromatographie d'exclusion dimensionnelle. Il est souhaitable que ces taux soient inférieurs à 2%, idéalement inférieurs à 0,5%.

Les anticorps conformes à l'invention peuvent
30 être préparés à l'aide d'un système d'expression recombinant; le système préféré est un système d'expression sur mammifère avec des cellules d'ovaire de hamster de Chine (CHO). Ces cellules peuvent être déficientes en dihydrofolate réductase (dhfr) et donc dépendantes de la
35 thymidine et de l'hypoxanthine pour leur croissance (PNAS 77 1980, 4216-4220). La lignée cellulaire CHO dhfr parentale est transfectée avec le gène pour l'anticorps et

le gène dhfr qui permet la sélection des transformants des cellules CHO du phénotype dhfr positif. La sélection est effectuée en cultivant les colonies sur des milieux exempts de thymidine et d'hypoxanthine dont l'absence empêche les
5 cellules non transformées de croître et empêche les cellules transformées de reconstituer le trajet du folate et ainsi de contourner le système de sélection. Ces transformants expriment habituellement de faibles taux du produit de gène en raison de la co-intégration des deux gènes transfectés.
10 Les taux d'expression du gène pour l'anticorps peuvent être augmentés par amplification avec du méthotrexate (MTX). Cet agent est un inhibiteur direct de l'enzyme dhfr et permet d'isoler les colonies résistantes qui amplifient leur nombre de copies du gène dhfr suffisamment pour survivre dans ces
15 conditions. Comme les gènes dhfr et pour l'anticorps sont plus étroitement liés dans les transformants d'origine, il y a habituellement amplification concomitante et par conséquent expression accrue du gène pour l'anticorps qui est souhaité.

20 Un autre système d'expression à utiliser avec les cellules CHO ou des cellules de myélome est le système d'amplification par la glutamine synthétase (GS) décrit dans le document WO87/04462. Ce système implique la transfection d'une cellule avec un gène codant pour l'enzyme GS et le
25 gène pour l'anticorps souhaité. Les cellules qui croissent sur un milieu exempt de glutamine sont ensuite sélectionnées. Ces clones sélectionnés sont ensuite soumis à l'inhibition de l'enzyme GS au moyen de méthionine sulfoximine (Msx). Pour survivre, les cellules amplifient
30 le gène GS avec amplification concomitante du gène codant pour l'anticorps.

De préférence, l'anticorps est obtenu sous une forme sous laquelle il est sécrété dans le milieu de culture. Le milieu récolté peut être ensuite filtré et/ou
35 concentré par ultrafiltration pour donner une solution aqueuse qui est soumise à une technique de purification qui comprend l'application d'une solution aqueuse de l'anticorps

a) sur une colonne de protéine A de façon à absorber l'anticorps sur la colonne, puis l'élution de l'anticorps avec une solution acide;

5 b) l'application de l'éluat acide sur une colonne échangeuse d'anions de particules chargées afin d'absorber l'anticorps, puis l'élution de l'anticorps avec une solution aqueuse d'ions de charge opposée;

10 c) l'application de l'éluat aqueux sur une colonne d'exclusion dimensionnelle de particules poreuses afin d'opérer la séparation suivant la dimension moléculaire et d'obtenir l'anticorps souhaité dans des fractions sélectionnées éluées de la colonne.

La protéine A est un ligand spécifique du groupe qui se lie à la région Fc de la plupart des IgG. Elle est
15 synthétisée par certaines souches de Staphylococcus aureus et peut être isolée des surnagants de culture, puis insolubilisée par fixation sur des perles d'agarose ou de silice. Une variante opératoire consiste à utiliser des bactéries entières d'une souche qui porte de grandes
20 quantités de protéines A à la surface des cellules bactériennes. Les préparations de gel des deux types sont disponibles sur le marché (Protéine A - Pharmacia. Whole bacteria Calbiochem, IgG sorb). (Alan Johnstone et Robin Thorpe *Immunochemistry in practice*, Blackwell Scientific
25 Publ. Chpt 10). Une variante à la protéine A est la protéine G (Analytical Chem. vol. 61 (13) 1989 1317).

La colonne qui est utilisée par préférence est une colonne de protéine A sur Sépharose, en particulier protéine A sur Sépharose Fast Flow (marque de commerce).
30 Idéalement, la colonne est lavée avec de la solution physiologique salée tamponnée au tris ou au phosphate au voisinage de pH 7,0 et l'anticorps est élué à un pH acide de 3,0 à 3,5, avantageusement à pH 3,0, à l'aide d'un acide comme l'acide citrique, par exemple d'une concentration
35 environ 0,1M.

La chromatographie par échange d'ions exploite les interactions entre les radicaux chargés d'une phase

stationnaire et de l'échantillon qui se trouve dans la phase mobile. La phase stationnaire d'une colonne échangeuse d'ions peut être un échangeur de cations portant des charges positives ou un échangeur d'anions portant des charges négatives. Les radicaux chargés sont neutralisés par des contre ions de charge opposée dans la phase mobile, les contre ions étant remplacés pendant la chromatographie par des molécules plus fortement chargées de l'échantillon. Il est préférable d'utiliser des colonnes réticulées à base, par exemple d'agarose, comme une colonne S-Sépharose Fast Flow (marque de commerce), en particulier une colonne échangeuse de cations S-Sépharose Fast Flow (marque de commerce). En variante, une colonne à membrane pourrait être utilisée. La colonne est d'habitude lavée, après l'application de l'éluat provenant de la colonne de protéine A, avec du tampon HEPES 20mM de pH 7,5 et l'anticorps est élué avec le même tampon contenant du chlorure de sodium 0,2M jusqu'à 0,075M.

La chromatographie d'exclusion dimensionnelle, comme le nom le suggère, opère la séparation sur la base de la dimension des protéines. En général, la séparation a lieu du fait que les grosses molécules sont empêchées de pénétrer dans la phase stationnaire poreuse et sont entraînées directement à travers la colonne, tandis que les molécules progressivement plus petites sont de plus en plus à même de pénétrer dans la phase stationnaire et ont donc des temps d'éluat particulièrement plus longs. C'est la porosité de la phase stationnaire qui détermine donc la séparation réalisée. Des matières appropriées sont chimiquement liées et offrent de la résistance à la compression, par exemple une composition d'agarose et/ou de dextrane comme le Superdex (marque de commerce). Une colonne préférée est une colonne d'exclusion dimensionnelle Superdex 200. L'éluat de la colonne échangeuse d'ions est de préférence appliqué sur la colonne de Superdex, puis développé dans un tampon d'un pH de 5 à 8, de préférence dans de la solution physiologique salée tamponnée au phosphate de pH 7,2.

Chaque colonne est de préférence protégée par un filtre qui peut être un filtre stérilisant Gelman Acro de 0,2 μm ou, dans le cas de la colonne de protéine A, un filtre PALL posidyne SLK 7002 NFZP ou PALL DSLK2 (disponible
5 chez Pall Process Filtration Ltd. European House, Havant Street, Portsmouth 301 3PD) et pour les deux autres colonnes, un filtre Millipak, de préférence Millipak 100 pour la colonne échangeuse d'ions et Millipak 20 ou 60 pour la colonne d'exclusion dimensionnelle (disponible chez
10 Millipore, The Boulevard, Blackmore Lane, Watford, Herts). Les colonnes sont de préférence désinfectées avant usage à l'aide d'un agent désinfectant approprié, par exemple du NaOH 0,5M pendant 16 heures pour l'une quelconque des colonnes, ou du gluconate d'hibitane à 2% dans l'éthanol à
15 20% pour la colonne de protéine A et du NaOH 1N pour les deux autres colonnes. Les agents désinfectants sont éliminés par lavage avec les tampons stériles appropriés avant l'application de la solution de protéine. Toutes les solutions utilisées dans le procédé sont de préférence
20 stériles et exemptes d'endotoxines.

Des stades supplémentaires peuvent être adjoints à la technique de purification exposée ci-dessus. L'ultrafiltration peut être appliquée pour réduire davantage la contamination par les acides nucléiques viraux et
25 cellulaires de l'hôte. Ceci peut être exécuté à l'aide d'unités d'ultrafiltration commercialisées, comme les membranes Viresolve/70' ou Viresolve/180', outre des membranes de cellulose régénérée PLMK opérant la coupure à 300k, toutes disponibles chez Millipore, The Boulevard,
30 Blackmore Lane, Watford, Herts. Une variante opératoire pour réduire la contamination virale est la microfiltration avec une membrane de Nylon dans une cartouche, par exemple une membrane de Nylon 66 0,04M de PALL.

Un stade de purification pour séparer l'ADN
35 contaminant peut être introduit, par exemple un lavage de la colonne de protéine A avec du NaCl 1M-3M dans du tampon à pH neutre, de préférence de la solution physiologique

salée tamponnée au phosphate à pH 7,2. De la glycine peut être ajoutée au NaCl, de préférence à peu près 1,5M, à un pH de 8,8 à 9,0.

5 La technique de l'ADN recombinant a procuré la possibilité de développer des anticorps modifiés de deux types fondamentaux.

Le premier type, appelé anticorps chimère, est celui où les domaines constants du rongeur seul sont remplacés par des domaines équivalents d'origine humaine
10 (Morrison et al, P.N.A.S., 1984, 81, 6851-6855; Boulianne et al, Nature, 1985, 314 268-270; et Neuberger et al, Nature, 1985 314, 268-270).

Le deuxième type est celui où les domaines constants de la souris et les régions charpente de la souris
15 sont tous remplacés par les domaines et régions équivalents d'origine humaine.

Le deuxième type d'anticorps est appelé anticorps humanisé ou CDR-greffé (Jones et al, Nature, 1986, 321, 522-525; et Riechmann et al, Nature, 1988, 332, 323-327). Ces anticorps ressemblent davantage aux anticorps humains lorsqu'ils sont administrés à un patient humain et ne suscitent pas de réponse anti-anticorps au même degré. Un anticorps humain pourrait être utilisé aussi.

De préférence, l'anticorps est un anticorps modifié tel qu'un anticorps hybride dans lequel les chaînes lourdes et légères sont homologues à celles d'un anticorps naturel, mais sont combinées d'une façon qui n'existerait pas naturellement.

L'anticorps peut être un anticorps chimère qui comprend des régions variables d'un
30

anticorps et des régions constantes d'un autre.

Ainsi, les anticorps chimères peuvent être des chimères espèce/espèce ou des chimères classe/classe. Ces anticorps chimères peuvent comprendre une ou plusieurs modifications supplémentaires pour améliorer l'aptitude de liaison de l'antigène ou modifier la fonction de l'effecteur.

Une autre forme d'anticorps modifié est un anticorps humanisé ou CDR-greffé comprenant un anticorps mixte, dans lequel des parties des régions hypervariables en plus des CDR sont transférées à la charpente humaine. Des acides aminés supplémentaires dans la charpente ou les régions constantes de ces anticorps peuvent être modifiés.

Les anticorps recombinants purifiés sont utiles en thérapeutique médicale pour le traitement de nombreuses affections humaines, généralement immunosuppressives, plus particulièrement, par exemple, les affections à médiation par les cellules-T, notamment la vasculite sévère, l'arthrite rhumatoïde, le lupus systémique, en outre les affections auto-immunes, comme la sclérose en plaques, la maladie greffe contre hôte, le psoriasis, le début du diabète juvénile, la maladie de Sjogren, l'affection thyroïdale, la myasthénie grave, la réjection de transplant et l'asthme. Ces anticorps sont utiles aussi pour le traitement de cancers tels que le lymphome non-Hodgkinien et les leucémies.

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'une

préparation purifiée d'un anticorps recombinant dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de l'une quelconque des affections précitées. Elle a aussi pour objet un procédé de traitement d'un être humain atteint d'une
5 telle affection, qui comprend l'administration à l'intéressé d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant.

Les doses de ces anticorps varient avec l'état à traiter et avec le receveur du traitement, mais se situent
10 dans l'intervalle de 1 à environ 100 mg pour un patient adulte, de préférence de 1 à 10 mg, d'habitude en administration quotidienne pendant une durée de 1 à 30 jours. Un régime d'administration en deux phases peut être préférable, avec administration de 1 à 5 mg pendant 5
15 à 10 jours, puis de 6 à 15 mg pendant encore 5 à 10 jours.

L'invention a aussi pour objet des compositions contenant une préparation purifiée d'un anticorps recombinant. Ces compositions comprennent de préférence, outre l'anticorps, un diluant ou excipient physiologiquement
20 acceptable facultativement en mélange avec d'autres agents tels que d'autres anticorps ou des antibiotiques. Des excipients appropriés sont entre autres, mais non limitativement, la solution physiologique salée, la solution physiologique salée tamponnée au phosphate, la solution
25 physiologique salée glucosée tamponnée au phosphate et la solution physiologique salée tamponnée. En variante, l'anticorps peut être lyophilisé (séché par le froid) et reconstitué suivant les besoins pour l'administration par addition d'une solution aqueuse tamponnée, telle que décrite
30 ci-dessus. Les voies d'administration sont les voies parentérales habituelles comprenant l'injection ou la perfusion intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée et intrapéritonéale.

Dans les dessins annexés :

35 la Fig. 1 représente :

(a) le produit construit pLD9 contenant des cassettes d'expression pour le marqueur de

sélection/amplification dhfr "infirme" et le cADN de la chaîne légère de Campath-1H. La petite boîte avec la flèche en traits interrompus est le promoteur de SV40 affaibli; la boîte plus grande en traits interrompus avec une flèche est
5 le promoteur β -actine; polyA désigne respectivement les signaux de début et de fin de polyadénylation; la petite boîte avec ori contient l'origine de réplication de SV40;

(b) le produit construit pNH316 contenant des cassettes d'expression pour le marqueur de sélection
10 néomycine et le cADN de la chaîne lourde de Campath-1H. La boîte avec une flèche et MT indique le promoteur métallothionéine de souris. Les sites de restriction indiqués sont H, HindIII; Bg, BglII; B, BamHI; R1, EcoR1;

la Fig. 2 représente un gel de polyacrylamide
15 avec SDS de Campath 1H non réduit et réduit montrant une bande principale unique;

la Fig. 3 est un chromatogramme à haute performance à inversion de phase du Campath 1H non réduit montrant un pic unique;

20 la Fig. 4 est un chromatogramme à haute performance à inversion de phase du Campath 1H réduit et carboxyméthylé montrant deux pics résolus qui correspondent aux chaînes lourdes et légères de l'anticorps;

la Fig. 5 est un chromatogramme d'exclusion dimensionnelle à haute performance du Campath 1H non réduit montrant un pic unique;

la Fig. 6 est un chromatogramme d'exclusion dimensionnelle à haute performance du Campath 1H réduit montrant deux pics majeurs.

30 EXEMPLE 1.-

Production de Campath 1H à partir de cellules CHO.

EXEMPLE 1A.-

Clonage des cADN des chaînes lourdes et légères pour Campath-1H.

35 On a greffé à l'origine les régions déterminantes de complémentarité du Campath-1G monoclonal de rat directement dans les charpentes des chaînes lourdes et

légères génomiques humaines (Winter et al, Nature, 1988, 322, 323-327). On a manipulé ces produits construits en vue de l'expression dans la lignée cellulaire de myélome YO, ce qui a donné des productions de Campath-1H s'élevant jusqu'à 5 µg/ml après 10 à 14 jours en culture (Hale et al, Tissue Antigens, 1990, 35, 118-127 et Winter et al, Nature, 1988, 322, 323-327). On a utilisé la lignée cellulaire de myélome TF57 (Hale et al, ibid,) pour engendrer des fractions de cADN sélectionnées suivant dimension de 0,9 à 1,2kb et de 1,4 à 1,7kb pour les cADN des chaînes légères et lourdes respectivement. On les a utilisées pour produire des banques de cADN comprenant un linker avec EcoR1 dans λgt10. Toutes les opérations ont été faites comme décrit par Huynh et al, [DNA Cloning, vol I : A Practical Approach, 1984, Glover, D (Editor), IRL Press, Oxford]. On a trié les banques avec des sondes à coupure déplacée au [³²P] spécifiques pour les régions variables aux fins d'isoler des clones de cADN en longueur complète. Pour le cADN des chaînes légères, on a supprimé l'amorce 5' (leader) non traduite jusqu'à la position -32 en utilisant l'exonucléase Bal-31 et un linker avec HindIII ajouté. Pour l'extrémité 3', on a fait usage d'un site SacI unique à 47 paires de base à l'amont du codon d'arrêt. On a utilisé une paire d'oligonucléotides synthétiques SacI-HindIII pour régénérer cette séquence et la position du site HindIII immédiatement après le codon d'arrêt. Pour l'extrémité 5' du cADN des chaînes lourdes, on a utilisé le site NcoI unique chevauchant le codon de départ ATG pour reconstruire une amorce (leader) non traduite de 29 paires de base, identiques à celle de la chaîne légère, en utilisant une paire d'oligonucléotides HindIII-NcoI. A l'extrémité 3', on a converti le site NaeI unique à 12 paires de base en aval du codon d'arrêt en un site HindIII en utilisant des linkers.

EXEMPLE 1B.-

35 Construction des vecteurs.

On a excisé le promoteur de β-actine humaine de pHBAPr-3-neo [qui correspond à pHBAPr-1-neo (Gunning et al,

P.N.A.S., 1987, 84, 483-35), sauf que le signal de polyadénylation/terminaison de SV40 a été remplacé par les signaux de β -actine humaine respectifs] sous la forme d'un fragment PvuII-HindIII de 2860 paires de base dans lequel le site PvuII a été ensuite converti en un site BgIII au moyen de linkers. Pour isoler de pHBAPr-3-neo les signaux de polyadénylation et de terminaison de la β -actine humaine, on a converti un site SphI à 1,4kilobase en aval du site HindIII unique en un site BamHI avec des linkers. On a construit comme décrit ci-après le vecteur dhfr fondamental appelé p104. On a converti le site SphI à la position -128 dans le promoteur de SV40 dans pSV2dhfr (Subramani et al, Mol. Cell. Biol., 1981, 1, 854-864) en un site SalI pour éliminer tous les éléments accélérateurs du promoteur. Ensuite, on a sous-cloné l'unité d'expression dhfr affaiblie, sous la forme d'un fragment SalI-BamHI, dans les sites homologues dans pSV0d (Mellon et al, Cell, 1981, 27, 279-288).

Pour construire pLD9, on a soumis le vecteur p104 à la digestion avec BamHI, à l'action de la phosphatase et à la ligation avec trois autres fragments consistant en le promoteur de β -actine BglII-HindIII, le cADN de chaîne légère de Campath-1H HindIII et les signaux polyA/terminaison de β -actine HindIII-BamHI. Pour construire pNH316, on a soumis le produit construit p δ BPV-MMTneo (Law et al, Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 2110-2115) à la digestion avec BamHI et à l'action de la phosphatase et on a isolé le fragment contenant le gène néomycine après une séparation sur un gel d'agarose. On a assemblé ce fragment par ligation aux deux fragments de β -actine et au cADN de chaîne lourde de Campath-1H. Les produits construits pLD9 et pNH316 sont représentés à la Fig. 1.

EXEMPLE 1C.-

Expression de Campath-1H dans des cellules CHO.

On a cultivé la lignée cellulaire CHO dhfr^r DUK-B11 (Urlaub et al, P.N.A.S., 1980, 77, 4216-4220) dans du MEM d'Iscove additionné de 10% de sérum foetal de veau,

de 4 $\mu\text{g/ml}$ d'hypoxanthine et de 4 $\mu\text{g/ml}$ de thymidine. On a coprécipité 10 μg de pLD9 et de pNH316 sur les cellules par le procédé au phosphate de calcium (Gorman et al, DNA Cloning, 1985, vol II, 143-190, Academic Press, N.Y.) et on
5 a sélectionné celles-ci d'après le double phénotype de dhfr⁺/résistance neo en recourant au milieu ci-dessus, mais en utilisant 10% de sérum dialysé, en omettant l'hypoxanthine/thymidine et en ajoutant du G418 (Gibco) à raison de 500 $\mu\text{g/ml}$. Pour certaines expériences, on a ajouté
10 du MTX directement au premier tour de sélection pour les transformants dhfr⁺. On a rassemblé plusieurs centaines de colonies résistantes et on y a recherché la production de l'anticorps Campath-1H dans le milieu de culture. La production moyenne a été de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pour les transformants
15 non amplifiés du premier tour.

Ensuite, on a cultivé la population de cellules rassemblées en présence de MTX 10^{-7}M et après deux semaines, on a rassemblé à nouveau les colonies résistantes sur lesquelles on a titré la production de Campath-1H. Il y a
20 eu une augmentation considérable de production jusqu'à 80 fois (Tableau I). On a cloné ces cellules par dilution, on les a triées en fonction de la production de Campath-1H et on a isolé deux lignées hautement productives dites A37 et 3D9 (Tableau I). On les amplifiées toutes deux davantage
25 en présence de MTX 10^{-6}M , puis on les a clonées par dilution et triées comme ci-dessus. L'augmentation d'expression à ce deuxième stade d'amplification final n'a pas été aussi importante que celle observée antérieurement, mais après remise en culture jusqu'à confluence, puis pendant encore
30 4 jours, les lignées cellulaires A39 et 3D11 ont été capables de produire jusqu'à 200 $\mu\text{g/ml}$ de Campath-1H.

TABLEAU ITaux d'expression de Campath-1H avec amplification pas à pas

5	Produit construit	Stade de sélection	Campath-1H accumulé ($\mu\text{g/ml}$)
	pLD9 + pNH316	pool de base dhfr ⁺ /neo	0,5
10		pool amplifié par MTX 10^{-7}M	18-40
		Lignées cellulaires A37 et 3D9	40
15		pool amplifié par MTX 10^{-6}M	60-90
		Lignée cellulaire A39	100
		Lignée cellulaire 3D11	150-200

A cet effet, on a laissé les cellules atteindre
 la confluence dans des flacons pour culture de tissu T-175,
 20 puis on les a alimentées de 50 ml de milieu frais pour
 culture de tissu et on les a fait croître pendant encore
 4 jours. On a mesuré suivant la technique ELISA l'anticorps
 Campath-1H accumulé dans le milieu au cours de cette durée.
 Les nombres totaux de cellules au jour du dosage ont été
 25 habituellement de $2,5 \times 10^7$. La production par la lignée
 cellulaire 3D11 traduit une productivité de $100 \mu\text{g}/10^6$
 cellules et par jour.

On a utilisé aussi les vecteurs de cotransfection
 pLD9 et pNH316 pour évaluer une stratégie d'amplification
 30 constituant une variante à celle décrite ci-dessus. On a
 cotransfecté les cellules CHO dhfr⁻ de la façon habituelle
 et deux jours plus tard, on les a réparties directement dans
 une série de flacons contenant du G418 (pour la sélection
 par la néomycine) et des concentrations croissantes en MTX
 35 s'échelonnant de $3 \times 10^{-9}\text{M}$ à 10^{-7}M . Après deux semaines de

cette sélection, on a établi par comptage le nombre de colonies résultantes et on a rassemblé celle-ci pour chaque flacon. Après stabilisation des populations cellulaires, on les a dosées pour connaître les titres en anticorps

5 Campath-1H; les résultats sont donnés au Tableau II. A mesure de l'augmentation de la concentration en MTX, on a observé une diminution marquée du nombre de colonies dhfr⁺ survivantes, mais celles-ci exprimaient proportionnellement plus de Campath-1H. Par conséquent, par une sélection

10 directe en un stade avec de fortes concentrations de MTX, il est possible d'isoler des populations de cellules qui offrent une augmentation de la production d'anticorps s'élevant jusqu'à 60 fois par comparaison avec les populations cellulaires sélectionnées pour des taux de dhfr

15 de base.

TABLEAU II

Taux d'expression de Campath-1H avec sélection directe.

Sélection (MTX M)	Colonies dhfr ⁺	Campath-1H accumulé (µg/ml)
Pas de MTX	500	0,5
3 x 10 ⁻⁹	40	2
10 ⁻⁸	5	7
3 x 10 ⁻⁸	5	30
25 10 ⁻⁷	-	-

On a rassemblé les colonies de chaque stade de sélection par le MTX et on a procédé au dosage comme décrit dans la légende du Tableau I.

On a répété cette technique de sélection après

30 une autre cotransfection de cellules et, en l'occurrence, on a sélectionné la population complète dans du milieu contenant du G418 et du MTX 3 x 10⁻⁸M. Ceci a donné une quantité plus importante de colonies résistantes qu'on a

ensuite rassemblées et amplifiées à nouveau deux fois en prenant des concentrations en MTX de $6 \times 10^{-7}M$, puis de $3 \times 10^{-6}M$. A ce stade, on a cloné les cellules par dilution et on les a triées en fonction des taux de Campath-1H. Les
5 deux lignées cellulaires les plus productives isolées ont été capables de produire des taux d'anticorps s'élevant jusqu'à 100 à 150 $\mu g/ml$ et ont été appelées lignées 4F11 et 5E10.

Les vitesses de croissance de ces lignées
10 cellulaires et des lignées A39/3D11 décrites ci-dessus étaient considérablement plus faibles que celles des cellules CHO dhfr^r non transformées d'origine. Ceci est une particularité commune de ces cellules lorsqu'elles ont été manipulées pour exprimer de hautes quantités d'un produit
15 de gène. Les rendements des lignées cellulaires 5E10 et 4F11 se sont révélés très variables dans le temps et la dernière lignée s'est révélée n'avoir qu'une durée de vie de passage limitée s'étendant sur environ 3 semaines avant d'entrer en crise et de mourir. Cette instabilité n'a nullement été
20 évidente dans les autres lignées cellulaires, bien qu'en général, les lignées isolées par la seconde technique d'amplification, y compris 5E10, aient habituellement été plus aléatoires à cultiver. Parmi toutes ces lignées, la lignée 3D11 a associé une croissance et une stabilité bonnes
25 avec de hauts rendements en Campath-1H. Pour assurer la propagation de ces caractéristiques, on a cloné par dilution la lignée cellulaire 3D11 une fois de plus pour obtenir la lignée 3D11* et celle-ci a de même donné des productions de Campath-1H s'élevant jusqu'à 200 $\mu g/ml$.

30 EXEMPLE 2.-

Croissance et production avec des cellules C1H 3D11* 44 dans un milieu exempt de sérum.

On a fait croître des cellules C1H 3D11* en monocouche dans du milieu d'Iscoves additionné de 10% de
35 sérum foetal de veau, d'acides aminés non essentiels, de Méthotrexate $10^{-6}M$ et d'antibiotiques jusqu'à environ 90% de confluence. On a dégagé les cellules de la matière plastique

avec le système trypsine/versène, on les a lavées dans du milieu d'Iscoves sans supplément et on les a centrifugées et remises en suspension à 5×10^4 /ml dans du milieu WCM4 détaillé au Tableau ci-après additionné de 0,25% de peptone, 5 de 0,1% de polyéthylène glycol (PEG) 10.000 et de 0,5% de sérum foetal de veau (FBS) sans méthotrexate (MTX). On a introduit dans trois flacons de 25 cm² 10 ml de la suspension de cellules additionnée d'hypoxanthine (H), de thymidine (T) ou de HT. On a incubé les flacons à 36,5°C 10 dans un incubateur à 5% de CO₂.

Après 6 jours, on a rassemblé les contenus des flacons et on les ajoutés à un volume égal de milieu additionné de Méthotrexate sans peptone ni PEG, puis on a transféré le tout dans un flacon de 75 cm².

15 On a utilisé ces cellules pour ensemercer un appareil rotatif Techne de 500 ml avant une incubation à 36,5°C avec rotation à 40 tours par minute. Les cellules ont continué de croître sans sérum pendant plus de cinq mois et bien qu'on ait observé que les cellules nécessitaient une 20 période d'adaptation, la vitesse de croissance et la viabilité se sont améliorées de façon constante. Le calcul a indiqué un temps de doublement de la population de 73,1 heures pendant environ 7 semaines, qui est tombé à 47,4 heures au cours des 20 jours suivants et s'est 25 stabilisé ensuite. La sécrétion d'anticorps est restée élevée avec des valeurs de plus de 60 µg/ml. L'intensité des bandes dans une analyse par transfert Northern a permis de déterminer que le nombre des copies du gène n'a pas diminué dans ces cellules.

30 Dans des fermenteurs, ces cellules ont produit de l'anticorps à raison de plus de 70 µg/ml et ont atteint avec régularité des taux de 100 µg/ml et davantage. Ces cellules sont dites C1H₃D11* 44.

Milieu WCM4

Iscoves DMEM [Iscove N et Melcher (1978), J Exp. Med. 1, 47, 923] modifiés pour exclure l'albumine de sérum de boeuf, la transférine et la lécithine.

5	+	5 ml/litre	L glutamine 200mM
	+	50 mg/litre	L proline
	+	50 mg/litre	L thréonine
	+	50 mg/litre	L méthionine
	+	50 mg/litre	L cystéine
10	+	50 mg/litre	L tyrosine
	+	25 mg/litre	acide ascorbique
	+	0,062 mg/litre	vitamine B6
	+	1,36 mg/litre	vitamine B12
	+	0,2 mg/litre	acide lipoïque
15	+	0,088 mg/litre	linoléate de méthyle
	+	1 μ M	méthotrécate
	+	1 mg/litre	FeSO ₄
	+	1 mg/litre	ZnSO ₄
	+	0,0025 mg/litre	CuSO ₄
20	+	5 mg/litre	insuline recombinante (Nucelline)
	+	50.000 UI/litre	polymyxine
	+	20.000 UI/litre	néomycine
	+	0,16 mg/litre	putrescine.2HCl

25 On a transféré des cellules C1H 3D11*44 du stade précédent qui avait eu une croissance de plus de 2 mois en l'absence de sérum dans un fermenteur SGI de 1 litre équipé d'un agitateur en acier inoxydable tournant à 70 tours par minute. On a réglé la température à 37°C, dO₂ à 10% et le pH

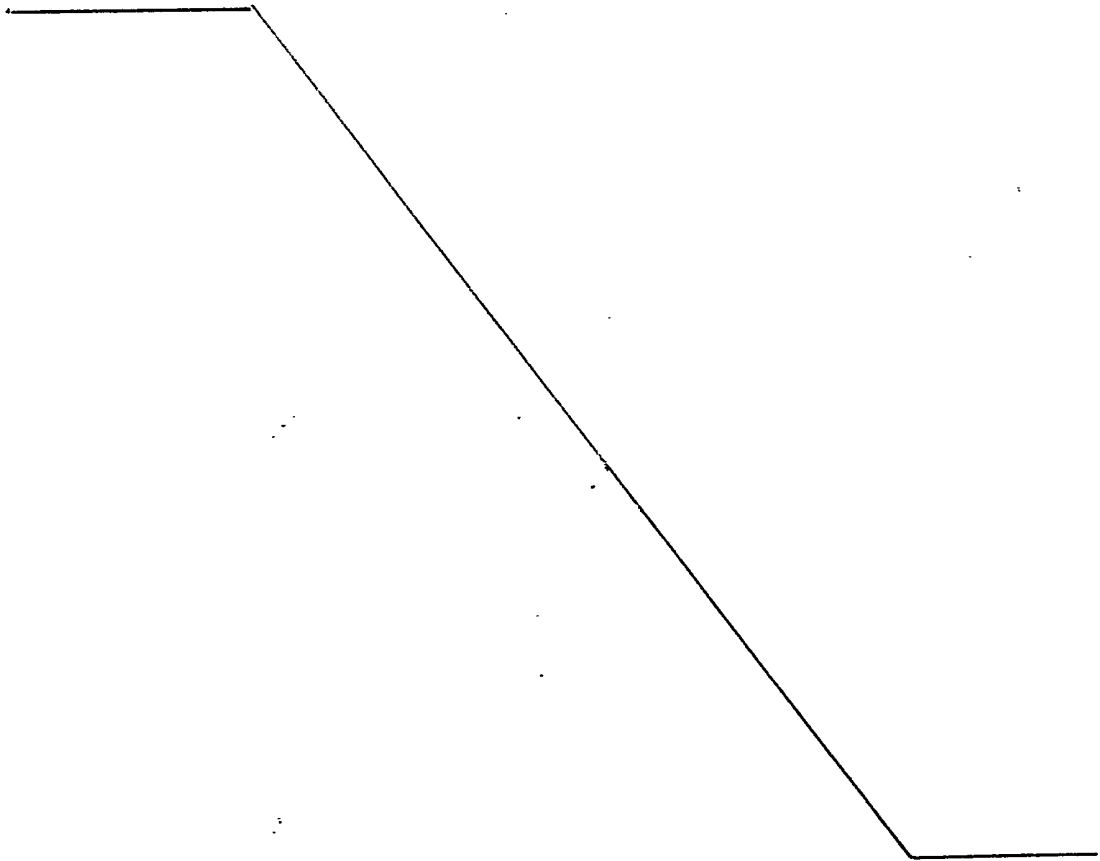
30 à 7-7,2. On aensemencé le fermenteur au jour 0 avec 0,22 x 10⁶ cellules/ml dans du milieu WCM4 contenant 0,1% de polyéthylène glycol (PEG) 10.000 et 0,25% de peptone de soya, et on y a introduit du O₂ par le dessus. On a soumis les cellules à des passages en routine avec du milieu frais

avec une allure de scission se situant typiquement entre 1 à 2 et 1 à 4.

Au jour 33, on a remplacé l'admission de gaz par le dessus par l'injection profonde, dont il est à prévoir
5 qu'elle induise davantage de dégâts physiques dans les cellules.

A partir du jour 50, on a utilisé le milieu WCM5 (voir tableau ci-après) conjointement avec de la peptone et du PEG au lieu du milieu WCM4.

10 Au jour 53, on a remplacé le PEG par 0,1% de Pluronic F68. La croissance résultante et les taux d'anticorps atteints ont été supérieurs à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans les fermenteurs.



Milieu WCM5

Iscoves DMEM modifié pour exclure l'albumine de sérum de boeuf, la transférine et la lécithine.

	+	5 ml/litre	glutamine 200mM L
5	+	50 mg/litre	L proline
	+	50 mg/litre	L thréonine
	+	50 mg/litre	L méthionine
	+	50 mg/litre	L cystéine
	+	50 mg/litre	L tyrosine
10	+	25 mg/litre	acide L ascorbique
	+	0,062 mg/litre	vitamine B6
	+	1,36 mg/litre	vitamine B12
	+	2 mg/litre	citrate ferrique
	+	1 mg/litre	sulfate de zinc
15	+	0,0025 mg/litre	sulfate de cuivre
	+	50.000 UI/litre	polymyxine
	+	20.000 UI/litre	néomycine
	+	3 µl/litre	éthanolamine
	+	0,16 mg/litre	putrescine
20	+	5 mg/litre	insuline recombinante (Nucelline)

Tous les composants des milieux WCM4 et WCM5 sont disponibles sur le marché.

EXEMPLE 3.-25 Purification du Campath-1H (G Dev-95).Matériels et procédés.

Le procédé de purification qui a été appliqué est basé sur la chromatographie dans trois colonnes. Les gels utilisés consistaient en 7,85 ml de protéine A Sépharose 4
30 Fast Flow, Pharmacia, n° de code 17-0974-04 (10 cm x 1 cm); en 7,85 ml d'échangeur de cations S Sépharose Fast Flow, Pharmacia, n° de code 17-0511-01 (10 cm x 1 cm); et en 120 ml de milieu d'exclusion dimensionnelle Superdex 200, Pharmacia, n° de code 17-1046-01 (60 cm x 1,6 cm). Chaque

colonne était protégée par un filtre stérilisant Gelman Acro de 0,2 μm .

Préparation de l'équipement et des solutions.

On a lavé la vaisselle des colonnes de protéine A
5 soigneusement avec du NaOH 1N et on l'a mise à reposer dans
cette solution pendant 24 heures pour éliminer l'endotoxine.
Ensuite, on a tassé le gel dans la colonne Pharmacia C10/20
et on l'a désinfecté avec 2% de gluconate d'hibitane dans
de l'éthanol à 20%. Du fait que suivant l'avis du fabricant,
10 les gels S Sépharose et Superdex 200 sont tous deux stables
dans le NaOH 1N pendant de longues durées, on a tassé ces
gels dans leurs colonnes (une colonne Pharmacia C10/20 et
une colonne Pharmacia C16/100, respectivement) et on les a
lavés au NaOH 1N, puis on les a mis à reposer dans cette
15 solution pendant 24 heures pour éliminer l'endotoxine et
désinfecter les colonnes. On a préparé les solutions pour
le fonctionnement et la désinfection des colonnes avec de
l'eau distillée apyrogène rendue stérile par filtration sur
des filtres Millipore Millipack 100 de 0,2 μm . On a dosé
20 l'endotoxine par LAL dans toutes les solutions et on a
utilisé uniquement celles donnant lieu à de faibles valeurs.

Fonctionnement des colonnes.

Gel de protéine A Sépharose 4 Fast Flow.

On a recueilli le milieu pour culture de tissu de
25 l'exemple 1 contenant l'anticorps Campath-1H et on l'a
filtré dans une enceinte Sealkleen à travers un filtre de
0,2 μm stérile PALL posidyne SLK7002 NFZP. Avec de l'eau
distillée, on a éliminé le gluconate d'hibitane à 2% dans
l'éthanol à 20% ayant servi à désinfecter la colonne de
30 protéine A et on amené le système à l'équilibre avec de la
solution physiologique salée tamponnée au tris de pH 7,5
(T.B.S.). Ensuite, on a chargé la colonne de protéine A avec
1,75 litre de Campath-1H brut (71,4 mg) à la vitesse de
300 cm/heure (235 ml/heure) à une température de 20°C \pm 5°C.
35 On a entraîné la matière non fixée hors de la colonne par
lavage avec 5 volumes de lit (39,25 ml) de T.B.S. de pH 7,5
à la même vitesse d'écoulement. On a élué le gel de

protéine A à 300 cm/heure avec de l'acide citrique 0,1M de pH 3,0 pendant <24 heures à la température ambiante. On a surveillé le profil d'élution à A280nm avec un moniteur Pharmacia UV1 à trajet unique et on a isolé le pic de la protéine. Le volume d'élution du pic a été de 18,9 ml et on a prélevé 1 ml de ce volume pour y doser le Campath-1H par ELISA, comme décrit ci-après.

Gel de S. Sépharose Fast Flow.

En utilisant de l'Hepes 20mM de pH 7,5, on a éliminé le NaOH 1N par lavage de la colonne de S. Sépharose jusqu'à ce que les liqueurs de lavage sortant de la colonne aient un pH de 7,5. On a introduit les 17,9 ml restants de l'éluat de la colonne de protéine A dans la colonne à la vitesse de 300 cm/heure (235 ml/heure). On a éliminé la matière non fixée de la colonne par lavage avec 7 volumes de lit (55 ml) d'Hepes 20mM de pH 7,5 à la même vitesse d'écoulement. On a élué le gel de S. Sépharose pas à pas avec du NaCl 0,2M dans de l'Hepes 20mM de pH 7,5 à la vitesse de 300 cm/heure. On a collecté le pic d'élution en surveillant la trace avec un moniteur Pharmacia UV1 à A280nm (longueur du trajet 2 mm, 0,5 unité d'absorption en fin d'échelle). On a commencé de collecter l'éluat à environ 20% de déflexion et on a poursuivi l'opération jusqu'à ce que la trace ait baissé jusqu'à 70% de déflexion. Le volume d'élution était de 10 ml et on en a prélevé 1 ml pour le dosage du Campath-1H par ELISA comme décrit ci-après.

Gel de Superdex 200.

En utilisant de la solution physiologique salée tamponnée au phosphate de pH 7,2, on a éliminé le NaOH 1N de la colonne de Superdex par lavage jusqu'à ce que les liqueurs de lavage sortant de la colonne aient un pH de 7,2. On a chargé les 9 ml restants de l'éluat de S. Sépharose sur la colonne de Superdex avec une seringue en passant par un filtre Millipore Millex GV et on a lavé le filtre soigneusement avec 2 ml de solution physiologique salée tamponnée au phosphate de pH 7,2 à 30 cm par heure (60 ml/heure). On a surveillé les pics d'exclusion

dimensionnelle avec un moniteur Pharmacia UV1 à A280nm. A mesure de l'éluion des pics, on a prélevé des fractions pour séparer le pic de l'agrégat du pic du monomère. La fraction contenant le pic du monomère avait un volume
5 de 17,6 ml.

Dosage par immunosorption avec enzyme liée (ELISA).

Cette technique est un immunodosage avec enzyme en sandwich standard où de l'IgG anti-humaine, isolée d'antisérum de chèvre purifié par immunité, est fixée
10 sur la phase solide comme couche de capture. La détection de l'antigène piégé (Ig Campath-1H) est réalisée avec de l'IgG anti-humaine de chèvre marquée à la peroxydase. Le dosage est séquentiel, les échantillons de Campath-1H étant dilués dans un tampon qui contient de la caséine et de la
15 gélatine hydrolysée. On utilise des durées d'incubation de 1 heure et de 30 minutes à la température de 37°C. On ajoute de la 3',3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) chromogène additionnée de peroxyde d'hydrogène comme substrat pour révéler toute peroxydase non liée. On peut déterminer les
20 densités optiques à 450nm et lire les concentrations en Campath-1H sur une courbe d'étalonnage établie d'après des concentrations connues qui s'échelonnent de 3,9ng à 250ng de Campath-1H purifié.

Essai du Campath-1H purifié.

25 On a estimé la teneur en protéine du pic de monomère à A280nm en prenant un coefficient d'extinction ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 1,35 (facultativement 1,32) et on a déterminé la teneur en agrégat d'un échantillon sur une colonne d'exclusion dimensionnelle HPLC. On a stérilisé la matière
30 restante par filtration à travers un filtre Millipore Millex GV (pores de 0,2 μm) et on l'a répartie dans 29 tubes de Sarstedt stériles en aliquotes de 0,5 ml. On a conservé la plupart des tubes d'échantillon à 4°C, mais on a conservé 6 tubes à -70°C. On a utilisé les échantillons conservés à
35 4°C pour les dosages tels que détaillés dans les exemples suivants.

Résultats et discussions.

Les résultats de l'ELISA sur Campath sont présentés au Tableau ci-dessous.

Campath-1H.

5	Echantillon	Titre par ELISA	Volume (ml) de la masse	mg de C1H au total dans la masse	Poids de C1H ap- pliqué sur la colonne suivante	Collecte/ colonne %
10	Brut	40,8 μg/ml	1750	71,4	71,4	----
15	Eluat de protéine A	4,2mg/ml	18,9	79,4	75,2	111,2
	Eluat de S Sépharose	6,4mg/ml	10,0	64,0	57,6	85,0
20	Monomère de Superdex	2,5mg/ml	17,6	44,0	----	76,4

La collecte totale pour le système des trois colonnes, sur la base de la collecte à chaque colonne, est de 61,6%.

Teneur en endotoxine par test LAL.

25	<u>Echantillon</u>	<u>UE/ml</u>
	Brut	1,25
	Pic du monomère de Superdex	<0,625

EXEMPLE 4.-

30 On a exécuté une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS classique sur un lit plat avec un gradient de 8 à 18% dans de l'Excelgel Pharmacia. Les résultats sont présentés à la Fig. 2.

EXEMPLE 5.-

Caractérisation du Campath-1H par chromatographie liquide à haute performance avec inversion de phase.

On a soumis un échantillon de 50 μ l du produit de l'exemple 3 (dit G-Dev-95) dans de la solution physiologique salée tamponnée au phosphate (PBS) d'une concentration de 2,4 mg/ml à la chromatographie liquide à haute performance avec inversion de phase (RP-HPLC) dans les conditions suivantes :

10 Colonne : PLRP-S 1000Å (dimension des pores); 8 μ m (dimension des particules) 15 cm x 0,46 cm de Polymer Laboratories Ltd UK.

Phase mobile utilisée : système acide formique/eau/acéto-nitrile dans lequel :

15 Composant A - Acide formique : eau (5:3)

Composant B - CH₃CN

dans le gradient suivant :

%	A	80	80	65	0	0	80	80
%	B	20	20	35	100	100	20	20
20	Temps (min)	0	5	38	41	50	51	65

On a fait fonctionner la colonne à la température ambiante au débit de 1 ml/minute avec détection dans l'UV sur un moniteur D LDC Spectro à longueur d'onde variable, à une longueur d'onde de 280nm avec une sensibilité de 25 0,1 unité d'absorption en fin d'échelle.

Résultat.

Comme le montre la Fig. 3, la chromatographie du Campath-1H avec le système ci-dessus donne un pic aigu unique. Les pics élués après 30 minutes sont dus à la phase 30 mobile.

EXEMPLE 6.-

Caractérisation du Campath-1H réduit et carboxyméthylé par chromatographie liquide à haute performance avec inversion de phase (RP-HPLC).

6a. Réduction et carboxyméthylation du Campath-1H.

Le Campath-1H peut être réduit en ses chaînes lourdes et légères constitutives suivant les techniques habituelles de réduction et de carboxyméthylation, qui
5 consistent à réduire d'abord les liaisons disulfure, puis à les empêcher de se reconstituer en alcoylant les radicaux thiol libres.

A 1 ml de Campath-1H G Dev-95 de l'exemple 3, dans de la solution physiologique salée tamponnée au
10 phosphate, à une concentration de 2,4 mg/ml, on a ajouté 1 ml de chlorure de guanidinium 8M dans du tampon au Tris.HCl 0,5M de pH 9,0 et 120 μ l de dithiothréitol à 7% dans le même tampon. On a incubé le mélange à 37°C pendant 2 heures.

15 Après l'incubation, on a ajouté 120 μ l d'acide iodoacétique à 9% dans du tampon au Tris.HCl 0,5M et on a mis le mélange à reposer à l'obscurité pendant 1 heure.

Le produit réduit et carboxyméthylé résultant est appelé Campath-1H RCM.

20 6b. Caractérisation du Campath-1H RCM par RP HPLC.

On a soumis 30 μ l du produit de l'exemple 6a à la chromatographie liquide à haute performance avec inversion de phase dans les conditions détaillées ci-après.

25 Colonne PLRP-S 1000Å (dimension des pores); 8 μ m (dimension des particules) 15 x 0,46 x cm, de Polymer Laboratories Ltd UK.

Phase mobile avec un gradient d'eau, d'acide formique et d'acétonitrile comme indiqué au Tableau ci-dessous :

A = acide formique

B = eau

C = acétonitrile

	%	A	50	50	29,4	0	0	50	0
5	%	B	35	35	20,6	0	0	35	35
	%	C	15	15	50	100	100	15	15
	Temps (min)		0	5	70	72	82	82,1	95

On a fait fonctionner la colonne au débit de 1 ml/minute à la température ambiante, en suivant l'absorbance dans l'UV à la longueur d'onde de 280nm.

Résultat.

Comme le montre la Fig. 4, le produit résultant se résout en deux pics qui correspondent aux chaînes lourdes et légères.

15 EXEMPLE 7.-

Caractérisation du Campath-1H par chromatographie d'exclusion dimensionnelle à haute performance pour la détermination des composants de haut poids moléculaire du Campath-1H.

20 On a soumis un échantillon de 50 μ l du produit de l'exemple 3 (G-Dev-95) dans de la solution physiologique tamponnée au phosphate (à une concentration de 2,4 mg/ml) à la chromatographie d'exclusion dimensionnelle à haute performance dans les conditions suivantes :

25 Colonne - gel TSK G3000 SWx1, 30 cm x 0,78 cm de diamètre intérieur

Phase mobile - Na_2HPO_4 0,05M + Na_2SO_4 0,1M ajusté avec H_3PO_4 à pH 6,8.

Débit - 0,75 ml/minute.

30 On a fait fonctionner la colonne pendant 24 minutes à la température ambiante en surveillant l'absorbance dans l'UV à la longueur d'onde de 280 nm.

On a analysé de la même façon un deuxième

échantillon de 50 μ l de Campath-1H réduit conformément à l'exemple 6a).

Résultats.

Les résultats à la Fig. 5 montrent un pic unique net indiquant deux taux d'agrégat. Des taux entre 0,5 et 2,0% sont généralement atteints. Les résultats à la Fig. 6 montrent deux pics principaux correspondants aux chaînes lourdes et légères dans le rapport prévu. Les pics au volume de perméation totale (environ 15 à 18 minutes) sont dus aux réactifs.

Dosage biologique du Campath-1H purifié fonctionnel.

Dosage par lyse du complément pour Campath-1H.

Le dosage par lyse du complément est une mesure de la fonction anticorps exprimée en activité spécifique, déterminée par l'aptitude d'une préparation purifiée d'un anticorps anti-CDx52 de concentration connue à se fixer sur un nombre déterminé au préalable de cellules et à provoquer la lyse des cellules.

Le dosage est exécuté sur du Campath-1H avec des cellules Karpas 422 [établies à partir d'une lignée de cellules B d'un lymphome non-hodgkinien; Dyer *et al.*, (1990) Blood, 75 704-714] exprimant l'antigène de Campath à la surface des cellules. Par incubation pendant 2 heures à 37°C dans un incubateur à CO₂ en présence de 600 μ Ci de ⁵¹Cr (chromate de sodium), on a chargé 1,2 x 10⁷ cellules d'un marqueur radioactif.

On a ajouté 5,3 ml des cellules chargées dans un milieu (volume total de 23,5 ml) à 12,5 ml de sérum humain normal et on a introduit à la pipette 150 μ l du mélange dans les puits d'une plaque de microtitrage.

On a mélangé des échantillons de 50 μ l de l'éluat final des trois tours de purification avec les cellules et on a procédé à l'incubation pendant 30 minutes à 4°C, puis pendant 90 minutes à 37°C. On a centrifugé la culture à 2000 tours par minute pendant 5 minutes et avec un compteur gamma, on a compté la radioactivité dans 100 μ l du surnagent des cellules. D'après une courbe étalon d'une préparation

de référence (1000 unités/ml), on a calculé l'activité de lyse du complément en kilo-unités/ml.

Les résultats sont détaillés au Tableau III.

On a estimé la concentration du Campath-1H dans les échantillons de 50 μ l de l'éluat final en prenant des échantillons dans de la solution physiologique salée tamponnée au phosphate de pH 7,2 lus sur un spectrophotomètre à 280nm. Les résultats sont exprimés au Tableau III sous la forme densité optique en mg/ml.

D'après ces données, l'activité spécifique en kilo-unités/mg est donnée par la relation :

$$\frac{\text{KU/ml}}{\text{DO}}$$

TABLEAU III

Echantillon	Lyse du complément kilo-unités par ml	Concentration de la protéine mg/ml	Activité spécifique kilo-unités
A	11,2	11,1	1,0
B	14,8	14,2	1,0
c	13,7	13,6	1,0

Les résultats montrent que les préparations purifiées de Campath-1H sont fonctionnelles.

REVENDEICATIONS

1. Préparation purifiée d'un anticorps recombinant qui présente:
 - 1) à la chromatographie d'exclusion dimensionnelle, un pic unique dans des conditions non réductrices et deux pics majeurs dans des conditions réductrices;
 - 2) à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS classique, une bande principale pour un échantillon non réduit et deux bandes principales pour un échantillon réduit;
 - 3) à la chromatographie liquide à haute performance avec inversion de phase, un pic unique dans des conditions non réductrices et deux pics principaux dans des conditions réductrices;
 - 4) une activité spécifique supérieure à 0,8 kilo-unité/mg.
2. Préparation purifiée selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a une activité spécifique supérieure à 0,9 kilo-unité/mg.
3. Préparation purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle a une activité spécifique voisine de 1,0 kilo-unité/mg.
4. Préparation purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps modifié.
5. Préparation purifiée selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps chimérique ou CDR-greffé.
6. Préparation purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps humain.
7. Préparation purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est produit par des cellules CHO.
8. Préparation purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que l'anticorps est

produit par des cellules de myélome.

9. Procédé de purification d'un anticorps recombinant, qui comprend l'application d'une solution aqueuse de l'anticorps sur :

- 5 a) une colonne de protéine A de façon à adsorber l'anticorps sur la colonne, et l'éluat de l'anticorps avec une solution acide;
- b) l'application de l'éluat acide sur une colonne échangeuse d'ions, de particules chargées de façon à adsorber l'anticorps, puis l'éluat de l'anticorps avec une solution aqueuse d'ions de charge opposée;
- 10 c) l'application de l'éluat aqueux sur une colonne d'exclusion dimensionnelle, de particules poreuses de façon à retenir les molécules qui ne sont pas l'anticorps dans les particules poreuses et obtenir l'anticorps recherché dans les fractions sélectionnées produites par la colonne.
- 15
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la colonne de protéine A est éluée à un pH acide
- 20 11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que la colonne de protéine A est éluée avec de l'acide citrique.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que la colonne de protéine A est une
- 25 colonne de protéine A Sépharose.
13. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la colonne échangeuse d'ions est une colonne échangeuse de cations.
14. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que
- 30 la colonne échangeuse d'ions est une colonne échangeuse d'anions.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, caractérisé en ce que l'anticorps est préparé dans du milieu dépourvu de sérum.
- 35 16. Composition contenant une préparation purifiée d'un anticorps recombinant suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8 et un diluant ou excipient

physiologiquement acceptable.

17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle est lyophilisée.

18. Composition selon l'une quelconque des revendications 16
5 ou 17 caractérisée en ce qu'elle est appropriée pour une administration parentérale ou sous-cutanée.

19. Préparation purifiée d'un anticorps recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à utiliser en immunothérapie.

10 20. Utilisation d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans la fabrication d'un médicament pour l'immunosuppression.

21. Utilisation d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8
15 dans la fabrication d'un médicament pour le traitement des affections à médiation par les cellules T.

22. Utilisation d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans la fabrication d'un médicament pour le traitement des
20 maladies autoimmunes.

23. Utilisation d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de cancers.

25 24. Utilisation d'une préparation purifiée d'un anticorps recombinant, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans la fabrication d'un médicament pour le traitement du lymphome non-Hodgkinien ou de leucémies.

30

35

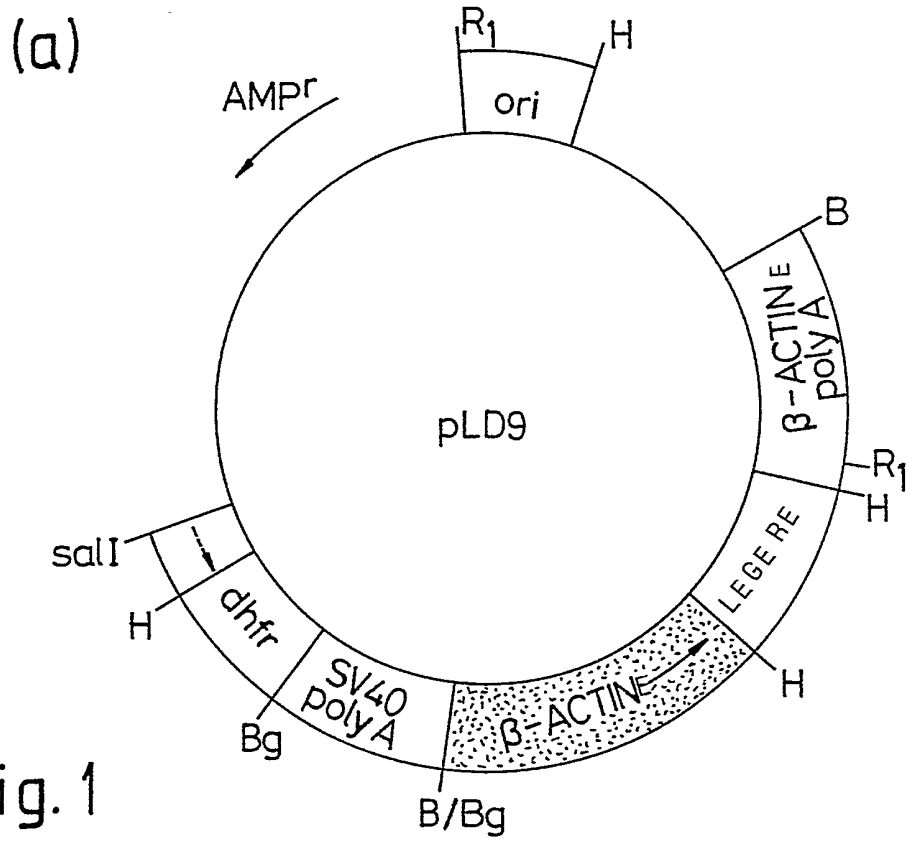


Fig. 1

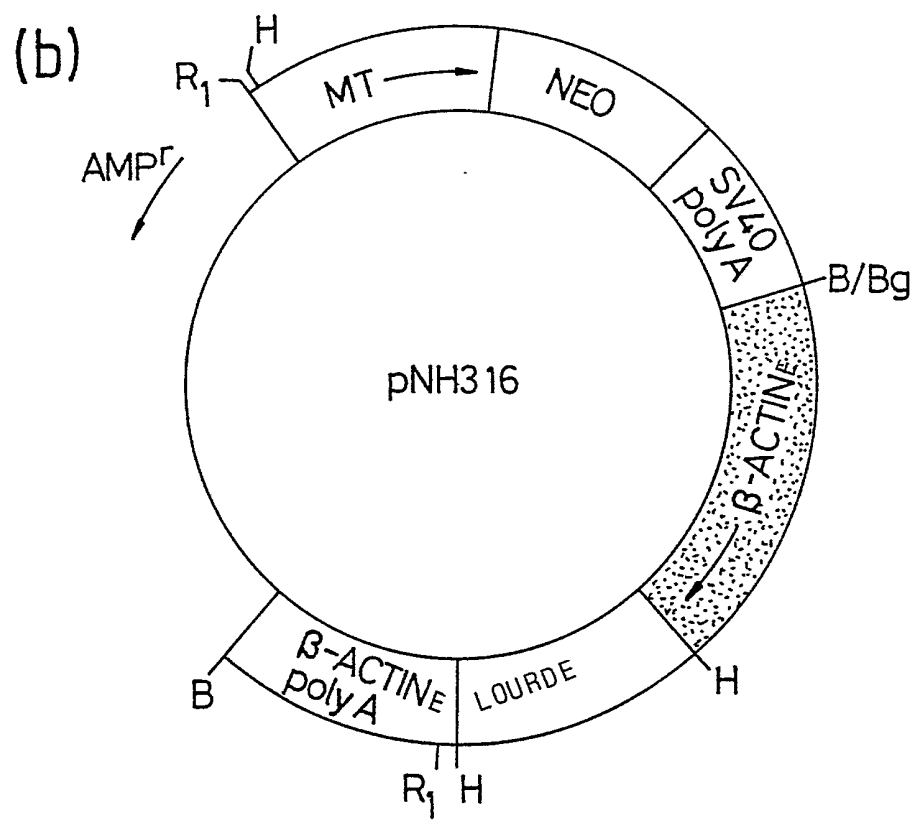
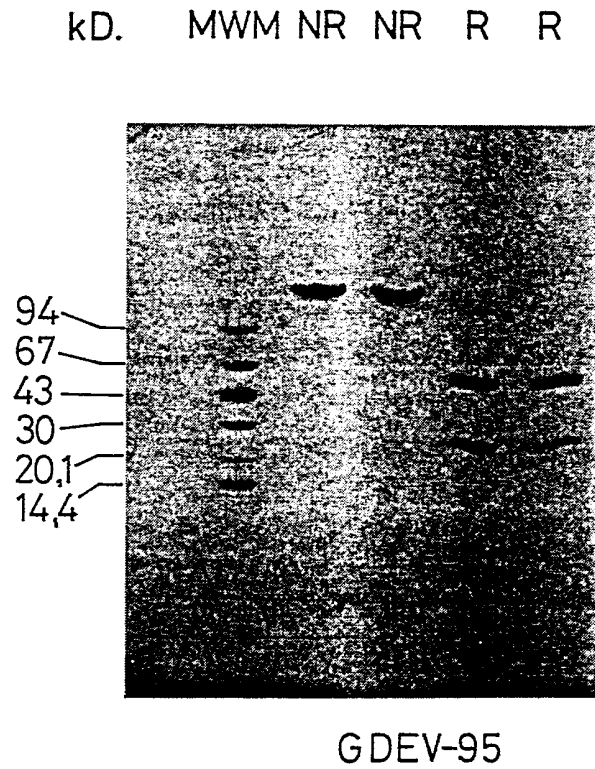


Fig. 2



MWM marqueurs de poids moléculaire

NR non réduit

R réduit

Fig. 3

Inversion de phase/non réduit

Analyse 6.1W

Echantillon B007

1457 200698

14:57 20/ 6/90

Méthode : RP CPH

Temps de rét.	Pic HT	Pic surface	Surface %	N° du pic	Pic début	Pic fin
1,82	22,76	107,02	2,050	1	1,75B	1,92B
2,27	3,24	137,40	2,632	2	2,00B	2,88V
3,40	2,09	153,14	2,934	3	2,88V	4,28B
14,53	232,98	3867,36	74,088	4	13,18B	15,70B
24,05	0,11	8,11	0,155	5	23,33V	24,25V
38,32	0,39	42,65	0,817	6	36,40B	39,70B
47,50	3,87	904,28	17,324	7	43,15B	49,98B

5219,96

Facteur
de traçage
0,02

4022,072

-102,000

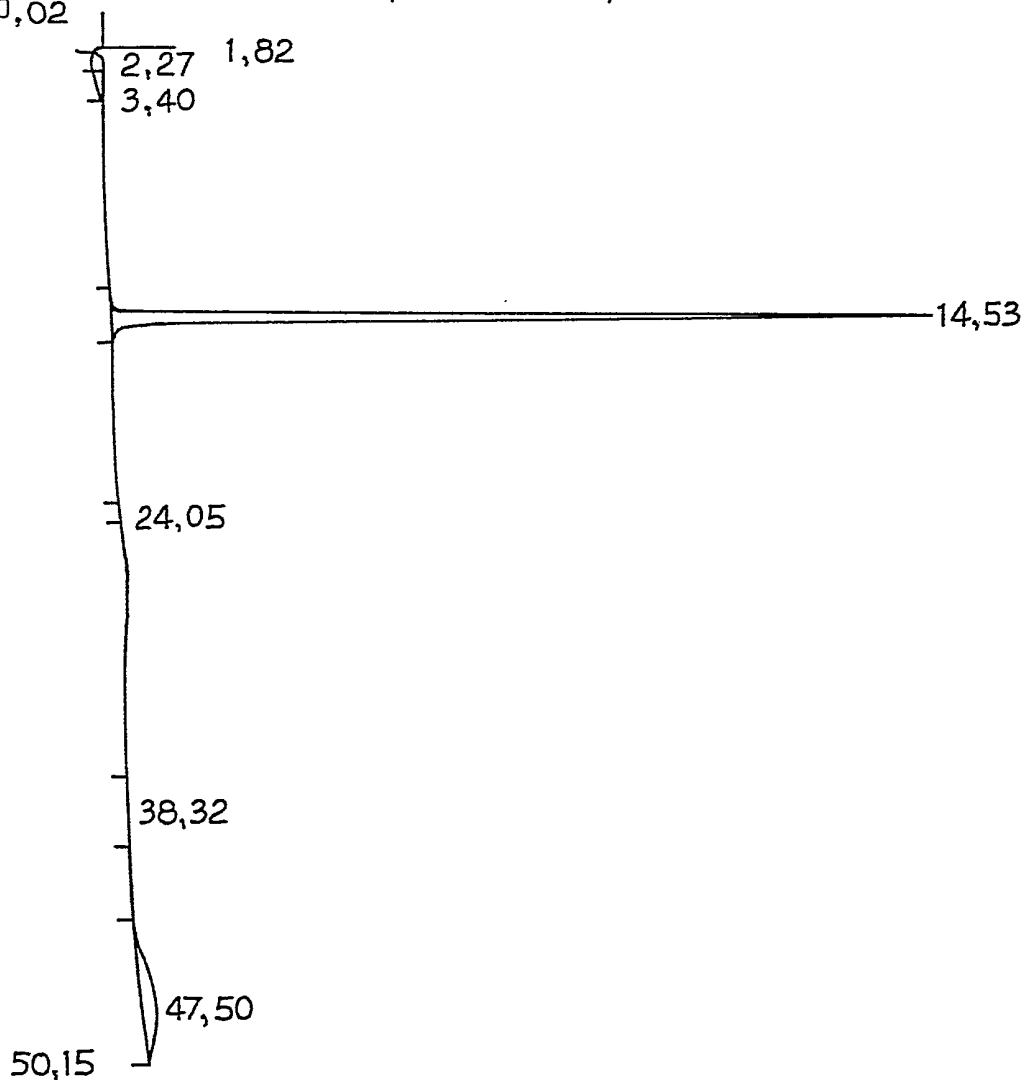


Fig. 4

Inversion de phase/réduit

Analyse 6.1W

Echantillon BOO5

1059 200690

10:59 20/6/90

Méthode : RP (RCM) CPIH

Temps de rét.	Pic HT	Pic surface	Surface %	N° du pic	Pic début	Pic fin
23,52	0,15	7,00	0,590	1	22,08B	24,20B
26,90	3,96	229,71	19,370	2	25,10B	29,88B
36,83	13,81	643,29	54,245	3	35,43B	39,27V
39,62	0,15	8,27	0,697	4	39,27V	41,18B
51,17	0,59	51,71	4,360	5	50,35B	53,40B
67,65	1,01	171,79	14,486	6	63,65V	67,75V
68,03	0,91	74,13	6,251	7	67,75V	69,98B
		<u>1185,90</u>				

Facteur de traçage 64629,937 230,991

10,00

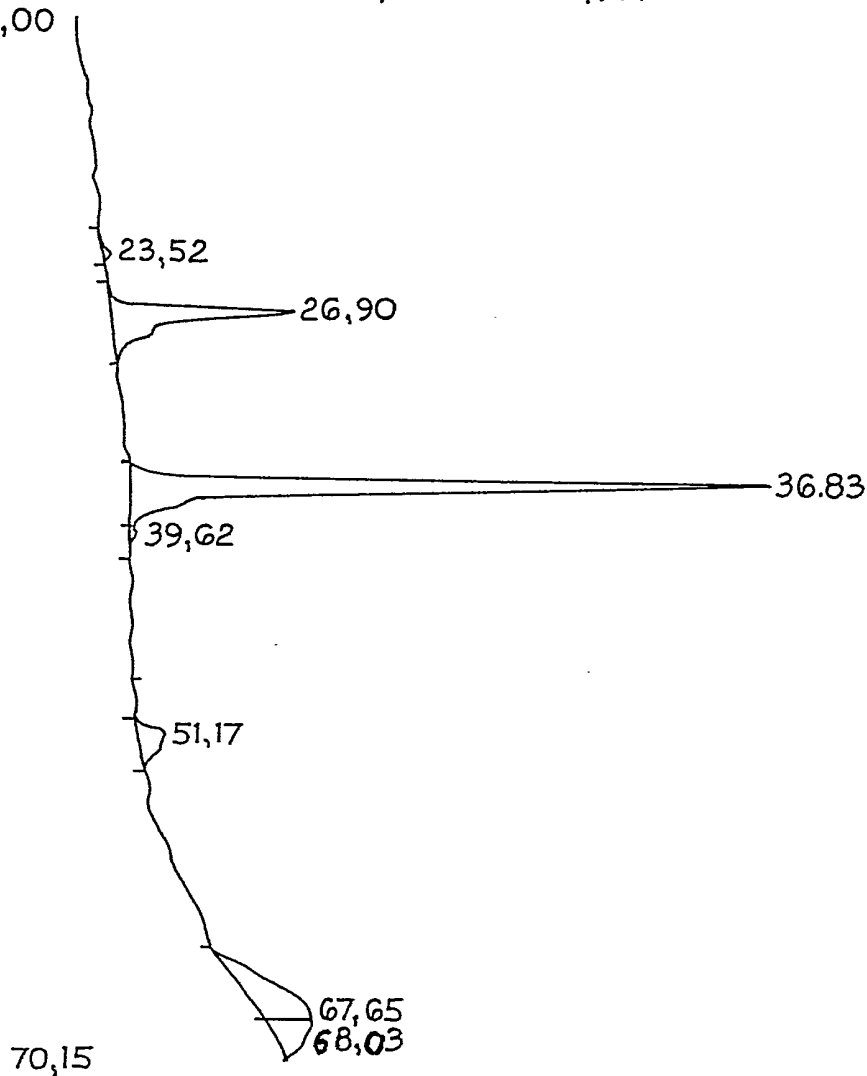


Fig. 5

Exclusion dimensionnelle/non réduit

Analyse 6.1W
 Echantillon D203 1345 200690 13:45 20/ 6/90
 Méthode : CPIH SEC G-DEV 95 Data 454

Temps de rét.	Pic HT	Pic de surface	Surface %	N° de pic	Pic début	Pic fin
10,32	264,03	7385,00D	100,000	1	9,42B	14,13BD
		<u>7385,00</u>				

Analyse 6.1W
 Echantillon D203 1345 200690 13:45 20/ 6/90
 Facteur de traçage 3645,516 -83,630

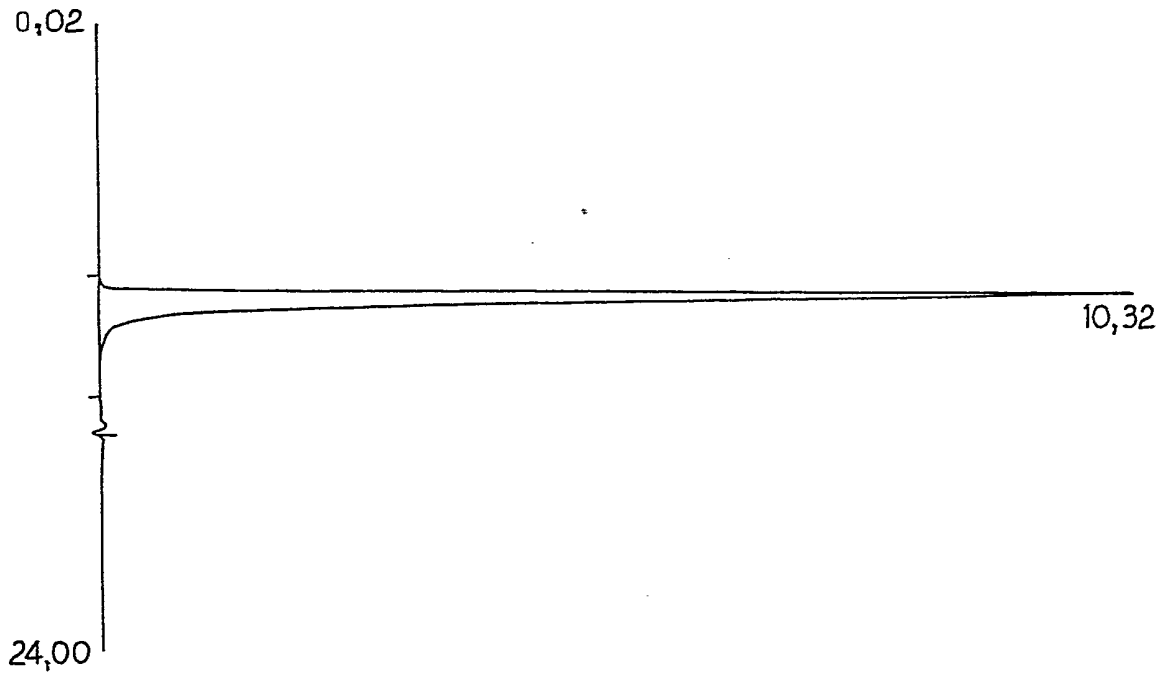


Fig. 6

Exclusion dimensionnelle/réduit

Analyse 6.1W
 Echantillon C104 1318 190690 13:18 19/ 6/90
 Méthode : SEC RCM CPIH

Temps de rét.	Pic HT	Pic surface	Surface %	N° de pic	Pic début	Pic fin
0,17	0,79	11,14	0,139	1	0,08B	1,38B
5,90	0,01	0,07	0,001	2	5,75B	6,00B
7,48	1,08	15,26	0,191	3	7,13B	7,55V
7,80	1,39	59,61	0,745	4	7,55V	8,43V
9,05	57,07	1838,27	22,965	5	8,43V	10,23V
10,72	23,52	876,32	10,948	6	10,23V	12,33B
14,17	0,00	0,09	0,001	7	13,88B	14,32B
15,88	1,37	15,60	0,195	8	15,80B	16,05B
16,52	19,18	310,43	3,878	9	16,10B	16,63V
17,20	94,47	4877,93	60,938	10	16,63V	20,60B
		8004,72				

