

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 558**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2016 PCT/IB2016/054926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17029620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2016 E 16766389 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 3337820**

54 Título: **Proceso de replegamiento mejorado de fragmentos de anticuerpo**

30 Prioridad:

**17.08.2015 IN 3118MU2015**

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

**19.07.2021**

73 Titular/es:

**LUPIN LIMITED (100.0%)  
Kalpataru Inspire, 3rd Floor, Off Western Express  
Highway, Santacruz (East), Maharashtra  
Mumbai 400 055, IN**

72 Inventor/es:

**SOMANI, SANDEEP;  
PANDEY, ASHISH;  
MISHRA, ASHOK y  
MODY, RUSTOM, SORAB**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 843 558 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

Proceso de replegamiento mejorado de fragmentos de anticuerpo

## 5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al proceso de producción de fragmentos de un anticuerpo tal como ranibizumab. Más específicamente, la presente divulgación proporciona un proceso para recuperar ranibizumab replegado de cuerpos de inclusión formados en células bacterianas.

10

## Antecedentes de la invención

Los fragmentos de anticuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales y generalmente carecen de glicosilación, lo que permite su producción en sistemas de expresión procariotas (Kurucz I *et al.*, Mol Immunol. 1995 32(17-18): 1443-52.). Aunque las construcciones génicas de estos fragmentos de anticuerpos más pequeños se obtienen fácilmente, la expresión de los fragmentos plegados resulta bastante difícil debido a las estructuras no nativas. Por otro lado, se pueden producir fácilmente en células bacterianas como cuerpos de inclusión (CI) siempre que se puedan replegar con éxito. Sin embargo, la formación de CI y el replegamiento de las proteínas insolubles han sido obstáculos importantes para utilizar plenamente las tecnologías de expresión citoplásmica de *Escherichia coli* (Tutomu Arakawa *et al.*, Antibodies 2014, 3:232-241). Ranibizumab (Lucentis) es un fragmento de anticuerpo monoclonal de isotipo kappa IgG1 humanizado recombinante diseñado para uso intraocular. Ranibizumab se une e inhibe la actividad biológica del factor A de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF-A). Ranibizumab tiene un peso molecular de aproximadamente 48 kilodaltons ya que carece de región Fc y solo está compuesto por Fab, por lo que es posible expresarlo mediante un sistema de expresión bacteriano, preferentemente en *E.coli*. El fragmento Fab corresponde a los dos brazos idénticos de la molécula de anticuerpo, que contienen las cadenas ligeras (CL) completas emparejadas con los dominios VH y CH1 de las cadenas pesadas (CP). Cuando los dominios de Fab de la CL y CP se sobreexpresan en el sistema bacteriano, ya sea en el mismo hospedador o en un hospedador separado, forman agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión contienen una proteína principalmente inactiva mal plegada en forma insoluble y convertirla en una conformación nativa activa siempre ha sido un desafío y se han descrito varios procesos para la recuperación de fragmentos de anticuerpos replegados. (Testuro Fujii *et al.*, J. Biochem. 2007 141: 699-707; Jin-Liang Xing *et al.*, World J Gastroenterol 2004 10(14): 2029-2033). Pero algunos de ellos no son escalables a escala industrial y otros producen proteínas mucho menos replegadas. Por otra parte, en investigaciones también se han intentado diferentes técnicas de replegamiento (Eliana De Bernardes Clark, Current Opinion in Biotechnology 1998, 9:157-163).

Además, todavía existe la necesidad en la técnica de proporcionar un proceso para la recuperación de alta calidad y cantidad de proteína replegada tal como ranibizumab de cuerpos de inclusión formados en células bacterianas. Por tanto, la presente invención proporciona un proceso eficaz para recuperar ranibizumab replegado de cuerpos de inclusión.

El documento WO 2014/178078 A2 describe la purificación de ranibizumab de cuerpos de inclusión.

WO 2006/058890 A2, Lee Myung-Hoon *et al.* (2003) J Biotechnol 101, 189-98, Wibbenmeyer *et al.* (1999) Biochim Biophys Acta Protein Struct Molec Enzym 1430, 191-202, y Fuhii *et al.* J Biochem (2007) 141, 699-707 describe procesos de replegamiento de fragmentos de inmunoglobulina a partir de proteínas solubilizadas.

## 50 Sumario de la invención

Los aspectos y las realizaciones de acuerdo con la presente invención se definen en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención proporciona un proceso para recuperar ranibizumab replegado, comprendiendo el proceso las etapas de:

55 a) aislar cuerpos de inclusión que comprenden una cadena ligera y una cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;

60 b) solubilizar dichos cuerpos de inclusión que comprenden una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende Tris-Cl 10 mM a 60 mM, urea 6 M a 8 M y DTT a un pH en el intervalo de 8,5 a 10;

65 c) replegar la cadena ligera y la cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tampón que comprende arginina 0,1 M a 1 M, sorbitol del 1 % al 8 % y Tris 10 mM a 60 mM que tiene un pH en el intervalo de 10 a 11 y una temperatura en el intervalo de 4 °C a 12 °C para un primer período de incubación de 1 a 25 horas y a continuación cambiar el pH y la temperatura del primer período de incubación a un pH en el

intervalo de 8 a 9 y una temperatura en el intervalo de 20 °C a 30 °C para un segundo período de incubación de 1 a 25 horas; y

d) recuperar dicho ranibizumab replegado.

5 En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado de los cuerpos de inclusión, comprendiendo el proceso las etapas de solubilización y replegamiento realizadas en las condiciones adecuadas de pH, temperatura y período de incubación.

10 En el presente documento se describe una solución solubilizada de la cadena pesada y/o la cadena ligera de ranibizumab tratada con tampón de replegamiento en condiciones adecuadas que incluyen pH, temperatura y período de incubación en donde el cambio de pH y temperatura se realiza en un intervalo adecuado para obtener alta calidad y cantidad de proteína replegada.

15 En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado comprendiendo el proceso las etapas de:

- a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;
- 20 b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH de aproximadamente 9;
- c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tampón en condiciones adecuadas con un pH alto y una temperatura baja hasta el primer período de incubación y a continuación cambiar las condiciones adecuadas a un pH bajo y una temperatura alta hasta el segundo período de incubación en donde el cambio de pH y temperatura se realiza entre el primer y el segundo período de incubación para obtener ranibizumab replegado;
- 25 d) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 30 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;
- b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5;
- 35 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas;
- 40 d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 20 horas para obtener ranibizumab replegado; y
- 45 e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 50 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;
- b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5;
- 55 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas;
- 60 d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 20 horas para obtener ranibizumab replegado; y
- e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

65

- a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;
- b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH de aproximadamente 9;
- 5 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH de aproximadamente 10, una temperatura de al menos aproximadamente 5 °C a 10 °C e incubada durante al menos aproximadamente 4 horas;
- d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH de aproximadamente 9, una temperatura de al menos aproximadamente 20 °C a 25 °C durante un periodo de incubación de al menos
- 10 aproximadamente 14 horas para obtener ranibizumab replegado; y
- e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso de purificación que incluye aclarar la solución que contiene el ranibizumab y a continuación poner en contacto dicho ranibizumab replegado en la solución clarificada con la columna de intercambio aniónico e intercambio catiónico y recuperar o eluir selectivamente el ranibizumab replegado de cada columna.

Breve descripción de las figuras:

- 20 Figura 1; Perfil de RP-HPLC de CI solubilizados y reducidos.  
 Figura 2; Perfil de RP-HPLC del replegamiento 1 a las 18 horas y patrón de referencia.  
 Figura 3; Perfil de RP-HPLC del replegamiento 1 y 2 en diferentes puntos temporales.  
 Figura 4; Perfil de RP-HPLC del replegamiento.  
 Figura 5; Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 8,7  
 25 Figura 6; Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 9,0  
 Figura 7; Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 9,3  
 Figura 8; Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 9,0

Descripción detallada de la invención

30 Definiciones:

Tal como se usa en el presente documento, "fragmento de anticuerpo" se refiere generalmente a proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Los fragmentos de anticuerpo se expresan como proteína heteróloga en la célula hospedadora. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo son ranibizumab, abciximab, anatumomab, arcitumomab, bectumomab, biciromab, certolizumab, citatuzumab bogatox, naptumomab, nofetumomab, sulesomab, tadocizumab, telimomab. En realizaciones preferidas el fragmento de anticuerpo es ranibizumab.

40 Tal como se usa en el presente documento, "factor de crecimiento endotelial vascular" o "VEGF", se refiere a un factor de crecimiento de mamífero derivado originalmente de células foliculares pituitarias bovinas que tienen la secuencia de aminoácidos descrita en Castor, C. W., *et al.*, (1991) *Methods in Enzymol.* 198:391-405, junto con sus derivados funcionales que tienen la actividad biológica cualitativa de un VEGF nativo correspondiente, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de aminoácidos del VEGF humano según se describe en Houck *et al.*, (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806-1814. Véase también, Leung *et al.* (1989) *Science*, 246:1306, y, Robinson & Stringer, (2001) *Journal of Cell Science*, 144(5):853-865, la Patente de Estados Unidos n.º 5.332.671. Este también se denomina VEGF-A.

50 Tal como se usa en el presente documento, "plegado correctamente" o "biológicamente activo" se refiere a una molécula con una conformación biológicamente activa y que realiza las actividades biológicas deseadas.

La expresión "proteína recombinante purificada" o "pura" y similares se refiere a un material libre de sustancias que normalmente lo acompañan como se encuentra en su producción recombinante y especialmente en cultivos de células procariotas o bacterianas. Por tanto, las expresiones se refieren a una proteína recombinante que está libre de ADN contaminante, proteínas de la célula hospedadora u otras moléculas asociadas con su entorno in situ. Las expresiones se refieren a un grado de pureza que es al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 98 % o más.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión proteína "mal plegada" se refiere a polipéptidos precipitados o agregados que están contenidos dentro de cuerpos de inclusión. Tal como se usa en el presente documento, anticuerpo anti-VEGF "insoluble" o "mal plegado" tal como ranibizumab u otra proteína recombinante se refiere a ranibizumab o proteína recombinante precipitada o agregada que está contenida dentro del periplasma o espacio intracelular de las células hospedadoras procariotas y asume una conformación biológicamente inactiva con enlaces disulfuro no emparejados o no formados. La proteína recombinante insoluble generalmente está contenida,

65 pero no necesariamente, en cuerpos de inclusión.

5 Tal como se usa en el presente documento, "agente caotrópico" se refiere a un compuesto que, en una concentración adecuada en solución acuosa, es capaz de cambiar la configuración espacial o conformación de polipéptidos mediante alteraciones en la superficie de los mismos para hacer que el polipéptido sea soluble en el medio acuoso. Las alteraciones pueden producirse cambiando, por ejemplo, el estado de hidratación, el entorno del disolvente o la interacción disolvente-superficie. La concentración de agente caotrópico afectará directamente a su fuerza y efectividad. Una solución caotrópica fuertemente desnaturizante contiene un agente caotrópico en grandes concentraciones que, en solución, desplegará efectivamente un polipéptido presente en la solución eliminando efectivamente la estructura secundaria de las proteínas. El despliegue será relativamente extenso, pero reversible. Una solución caotrópica moderadamente desnaturizante contiene un agente caotrópico que, en suficientes concentraciones en solución, permite el plegamiento parcial de un polipéptido de cualquier conformación retorcida que el polipéptido haya asumido a través de intermedios solubles en la solución, en la conformación espacial en la que se encuentra cuando opera en su forma activa en condiciones fisiológicas endógenas u homólogas. Los ejemplos de agentes caotrópicos incluyen clorhidrato de guanidina, urea, e hidróxidos, tales como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Los agentes caotrópicos incluyen una combinación de estos reactivos, tales como una mezcla de un hidróxido con urea o clorhidrato de guanidina.

20 Tal como se usa en el presente documento, "agente reductor" se refiere a un compuesto que, en una concentración adecuada en solución acuosa, mantiene los grupos sulfhidrilo libres de manera que los enlaces disulfuro intra o intermoleculares se rompen químicamente. Los ejemplos representativos de agentes reductores adecuados incluyen ditioneitol (DTT), ditioeritrol (DTE), beta-mercaptoetanol (BME), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutatión y borohidruro de sodio.

25 Tal como se usa en el presente documento, "solución tamponada" se refiere a una solución que resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base.

Tal como se usa en el presente documento, "primera solución tamponada" se refiere a un tampón de solubilización usado para solubilizar los cuerpos de inclusión.

30 Tal como se usa en el presente documento, "segunda solución tamponada" se refiere a un tampón de replegamiento utilizado para recuperar una conformación de proteína replegada deseada de una proteína insoluble mal plegada.

35 En el presente documento se describe un proceso para recuperar y purificar proteínas recombinantes replegadas de una célula hospedadora bacteriana. Los procesos descritos en el presente documento son ampliamente aplicables a fragmentos de anticuerpos como Fab, ScFv que incluye pero sin limitación ranibizumab, abcximab, anatumomab, arcitumomab, bectumomab, biciromab, certolizumab, citatuzumab bogatox, naptumomab, nofetumomab, sulesomab, tadocizumab, telimomab. En una divulgación preferida el fragmento de anticuerpo es ranibizumab.

40 En el presente documento se describe un proceso para la recuperación de la proteína replegada a partir de la proteína insoluble formada en el espacio intracelular o en el espacio periplásmico de la célula hospedadora bacteriana. En una divulgación, los cuerpos de inclusión se aíslan de la célula procariota según el proceso conocido en la técnica. Los cuerpos de inclusión aislados comprenden principalmente proteínas e impurezas insolubles mal plegadas. En determinadas divulgaciones, los procesos y procedimientos son aplicables a la fabricación o producción a escala industrial, replegamiento y purificación de la proteína recombinante.

45 En una divulgación, los CI aislados comprenden la cadena pesada y/o la cadena ligera de ranibizumab en el sedimento y a continuación se incuban en una primera solución tamponada suficiente para solubilizar sustancialmente los CI. Esta incubación tiene lugar en condiciones adecuadas de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permitirán la solubilización de la cantidad deseada o sustancialmente todos los CI. En tal divulgación, la reducción se lleva a cabo con un agente reductor adecuado durante aproximadamente 30 minutos a 45 minutos y, después, la solución reducida se filtra y se usa adicionalmente para replegar.

50 En una divulgación, el primer tampón comprende Tris-Cl, Urea. En ciertas divulgaciones, el Tris-Cl está presente en una concentración seleccionada de 10 mM a 60 mM, preferentemente 50 mM. En ciertas divulgaciones, la urea está presente en una concentración seleccionada de 6 M a 8 M, preferentemente 8 M. En una realización, el pH de la primera solución tampón se selecciona de 8,5 a 10, preferentemente 9.

55 En una divulgación, los agentes caotrópicos se seleccionan de clorhidrato de guanidina, urea, e hidróxidos, tales como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

En una divulgación, el agente reductor se selecciona de ditioneitol (DTT), ditioeritrol (DTE), beta-mercaptoetanol (BME), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutatión y borohidruro de sodio.

65 En una divulgación, la cadena pesada y/o ligera solubilizada de ranibizumab se trata adicionalmente con una segunda solución tampón o tampón de replegamiento para realizar el replegamiento. La segunda solución tampón

que comprende condiciones adecuadas con un pH alto y una temperatura baja hasta el primer período de incubación y a continuación mantener las condiciones adecuadas a un pH bajo y una temperatura alta hasta el segundo período de incubación en donde el cambio de pH y temperatura se realiza entre el primer y el segundo período de incubación.

5 En una divulgación, la cadena ligera y/o pesada solubilizada de la solución de ranibizumab se trata con una segunda solución tamponada en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, y a continuación el cambio del pH y la temperatura se realiza a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 14 horas a aproximadamente 20 horas. En tal divulgación, el cambio de pH significa cambiar el pH de pH 10 a 11 a pH 8 a 9. En determinadas divulgaciones, el cambio de pH significa cambiar el pH de pH 10 a 11 a pH 8 a 9,5. El cambio de temperatura significa cambiar la temperatura de 4 °C a 12 °C a 20 °C a 30 °C.

En ciertas divulgaciones el primer periodo de incubación se selecciona de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 25 horas. Preferentemente, el primer período de incubación se selecciona de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 15 horas. Preferentemente, el primer periodo de incubación es de aproximadamente 4 horas.

En ciertas divulgaciones el segundo periodo de incubación se selecciona de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 25 horas. Preferentemente, el primer período de incubación se selecciona de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 25 horas. Preferentemente, el primer periodo de incubación es de aproximadamente 14 horas.

En una divulgación, el segundo tampón comprende Tris, arginina y sorbitol. En ciertas divulgaciones, el Tris está presente en una concentración seleccionada de 10 mM a 60 mM, preferentemente 50 mM. En ciertas divulgaciones, la arginina está presente en una concentración seleccionada de 0,1 M a 1 M, preferentemente 0,6 mM. En ciertas divulgaciones, el sorbitol está presente en una concentración seleccionada de 1 % a 8 %, preferentemente del 5 %.

En ciertas divulgaciones, el segundo tampón comprende agente oxidante en una concentración seleccionada de 1 mM a 10 mM. En una divulgación la concentración de agente oxidante es 3 mM. En ciertas divulgaciones el agente oxidante se selecciona de cisteína, glutatión oxidado (GSSG), sulfato de cobre, deshidroascorbato, tiosulfato de sodio. En una realización, el agente oxidante es cistina.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado comprendiendo el proceso las etapas de:

- 40 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;  
b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH de aproximadamente 9;  
c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tampón en condiciones adecuadas con un pH alto y una temperatura baja hasta el primer período de incubación y a continuación cambiar las condiciones adecuadas a un pH bajo y una temperatura alta hasta el segundo período de incubación en donde el cambio de pH y temperatura se realiza entre el primer y el segundo período de incubación para obtener ranibizumab replegado;  
45 d) recuperar dicho ranibizumab replegado.

50 En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 55 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;  
b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5;  
c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas;  
60 d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 20 horas para obtener ranibizumab replegado; y  
65 e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 5 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;  
b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5;  
10 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 25 horas;  
15 d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 25 horas para obtener ranibizumab replegado; y  
e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

20 En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 25 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;  
b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5;  
30 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH seleccionado de aproximadamente pH 10 a aproximadamente pH 11, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 4 °C a aproximadamente 12 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas;  
35 d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH seleccionado de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5, una temperatura seleccionada de al menos aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C e incubada durante un período seleccionado de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 20 horas para obtener ranibizumab replegado; y  
e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En el presente documento se describe un proceso para recuperar ranibizumab replegado que comprende las etapas de:

- 40 a) aislar una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;  
b) solubilizar dicha cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende un agente caotrópico y/o un agente reductor a un pH de aproximadamente 9;  
45 c) replegar dicha cadena ligera y cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tamponada que comprende un agente oxidante en condiciones adecuadas con un pH de aproximadamente 10, una temperatura de al menos aproximadamente 5 °C a 10 °C e incubada durante al menos aproximadamente 4 horas;  
d) realizar un cambio en las condiciones adecuadas de la etapa (c) que comprende un pH de aproximadamente 9, una temperatura de al menos aproximadamente 20 °C a 25 °C durante un período de incubación de al menos aproximadamente 14 horas para obtener ranibizumab replegado; y  
50 e) recuperar dicho ranibizumab replegado.

En una divulgación, el ranibizumab replegado se purifica usando métodos de cromatografía adecuados. En una realización preferida, el ranibizumab replegado se filtra y a continuación se somete a una columna de intercambio aniónico y una columna de intercambio catiónico.

En una divulgación, el proceso de purificación de ranibizumab replegado comprende una o más impurezas, en donde el método comprende:

- 60 (a) una primera cromatografía de intercambio aniónico;  
(b) una segunda cromatografía de intercambio aniónico; y  
(c) una cromatografía de intercambio catiónico;  
(d) opcionalmente la filtración se puede realizar antes de la etapa (a) o la etapa (c).

65 En una divulgación, el proceso de purificación de ranibizumab replegado comprende una o más impurezas, en donde el método comprende:

(a) cargar la composición que comprende ranibizumab replegado y una o más impurezas en una primera columna de cromatografía de intercambio aniónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 y eluir la columna con un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 para obtener una primera solución de elución;

(b) cargar la primera solución de elución obtenida de la etapa (a) en una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 y eluir la columna con un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 para obtener una segunda solución de elución; y

(c) cargar la segunda solución de elución obtenida de la etapa (b) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6,5 y eluir el ranibizumab unido usando un gradiente de sal.

En una divulgación, el proceso de purificación de ranibizumab replegado comprende una o más impurezas, en donde el método comprende:

(a) cargar la composición que comprende ranibizumab replegado y una o más impurezas en una primera columna de cromatografía de intercambio aniónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 9,5 y eluir la columna con un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5 para obtener una primera solución de elución;

(b) cargar la primera solución de elución obtenida de la etapa (a) en una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 9,5 y eluir la columna con un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5 para obtener una segunda solución de elución; y

(c) cargar la segunda solución de elución obtenida en la etapa (b) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico equilibrada con un tampón de equilibrio que tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0 y eluir la columna con un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0 para obtener el anticuerpo purificado de interés;

(d) opcionalmente la filtración se puede realizar antes de la etapa (a) o la etapa (c).

La invención se puede ilustrar mediante los ejemplos siguientes.

#### Ejemplo 1

Se solubilizaron 36 g de cuerpos de inclusión (CI) obtenidos tras la fermentación, cosecha y aislamiento de los CI en alrededor de 720 ml del primer tampón comprendido por Urea 8 M, Tris 50 mM a pH 9 y la reducción se realizó usando DTT 4 mM durante 45 minutos. Los CI solubilizados y reducidos se filtraron a continuación con un filtro de 0,8 + 0,2  $\mu$ m.

El perfil de los CI solubilizados se determinó mediante RP-HPLC como se muestra en la Figura 1. Los picos de la cadena pesada y ligera se pueden observar en el perfil.

A continuación se añadieron alrededor de 360 ml de solución de CI solubilizados y reducidos a alrededor de 8640 ml de tampón de replegamiento constituido por arginina 0,6 M, sorbitol al 5 % y Tris 50 mM a pH 10 y una temperatura de 5 -10 °C en 1 h a caudal constante. El replegamiento a este pH se llevó a cabo durante 4 h y a continuación el pH de la solución de replegamiento se ajustó a 9 con un ácido. La temperatura también se incrementó a 20-25 °C después del ajuste del pH. El replegamiento continuó durante 14 horas más. El perfil de RP-HPLC se muestra en la Figura 2 y la Figura 3, que se denomina replegamiento 1. El pico de Fab replegado se puede observar en el perfil.

#### Ejemplo 2

Se solubilizaron 21,5 g de cuerpos de inclusión (CI) obtenidos tras la fermentación, cosecha y aislamiento de los CI en alrededor de 430 ml del primer tampón constituido por Urea 8 M, Tris 50 mM a pH 9 y la reducción se realizó usando DTT 4 mM durante 45 minutos. Los CI solubilizados y reducidos se filtraron a continuación con un filtro de 0,8 + 0,2  $\mu$ m.

A continuación se añadieron alrededor de 400 ml de CI solubilizados y reducidos a alrededor de 9,5 l de tampón de replegamiento constituido por arginina 0,6 M, sorbitol al 5 %, Tris 50 mM que tenía un pH 9 y una temperatura de 5-10 °C en 1 h a caudal constante. El replegamiento se llevó a cabo durante alrededor de 45 h. Este replegamiento se denomina replegamiento 2. La pureza de la proteína replegada obtenida a las 24 horas es del 8,1 % y el rendimiento de la proteína replegada obtenida a las 24 horas es del 3,1 %. El perfil de RP-HPLC se muestra en la Figura 2 y 3 y se denomina replegamiento 2. Por tanto, a partir de los resultados de RP-HPLC se observó que el replegamiento 1 daba un replegamiento mayor en 18 h en comparación con el replegamiento 2 durante 45 h.

#### Ejemplo 3

Se solubilizaron 100 g de cuerpos de inclusión obtenidos tras la fermentación, cosecha y lavado de los CI en 1500 ml de tampón de solubilización (urea 8 M, Tris 50 mM pH 9) y la reducción se realizó usando DTT 4 mM durante 45 minutos. A continuación se filtraron los CI solubilizados y reducidos.

- 5 Se añadieron 800 ml de CI solubilizados y reducidos a ~19 l de tampón de replegamiento (arginina 0,6 M, sorbitol al 5 %, Tris 50 mM, pH 10) a 5-10 °C en 1 h a caudal constante. El replegamiento en estas condiciones se continuó durante aproximadamente 4 a 5 h. Después de eso, se extrajeron tres alícuotas (2 l cada una) de la solución de replegamiento de 19 l y el pH de cada alícuota se ajustó a 8,7, 9,0 y 9,3 respectivamente con HCl 6 N y el replegamiento en esta condición se continuó hasta 21 a 28 horas a temperatura de 21 a 25 °C. El perfil RP-HPLC de replegamiento a diferentes pH se muestra en la figura 5 a la figura 7. El perfil muestra que el replegamiento dentro del intervalo de pH estudiado da un replegamiento casi similar.
- 10

#### Ejemplo 4

- 15 Se solubilizaron alrededor de 1,6 kg de cuerpos de inclusión obtenidos después de la fermentación, cosecha y lavado de los CI en ~32 l de tampón de solubilización (urea 8 M, Tris 50 mM pH 9) y la reducción se realizó usando DTT. A continuación se filtraron los CI solubilizados y reducidos.

Los CI solubilizados y reducidos se añadieron a alrededor de 800 l de tampón de replegamiento (arginina 0,6 M, sorbitol al 5 %, Tris 50 mM, pH 10,1) a 5-10 °C en 1 h a caudal constante. El replegamiento en estas condiciones se continuó durante aproximadamente 4 a 5 h y el pH del replegamiento se ajustó a 9,1 con HCl 6 N. La temperatura de replegamiento se incrementó a 21-25 °C y el replegamiento continuó hasta 21-22 h. El perfil de RP-HPLC del replegamiento se muestra en la figura 4. La pureza y el rendimiento de la proteína replegada es 47,3 % y 13,6 % respectivamente.

20

#### Ejemplo 5

- Se solubilizaron 45 g de cuerpos de inclusión obtenidos tras la fermentación, cosecha y lavado de los CI en 900 ml de tampón de solubilización (urea 8 M, Tris 50 mM pH 9) y la reducción se realizó usando DTT 4 mM durante 45 minutos. A continuación se filtraron los CI solubilizados y reducidos.
- 25

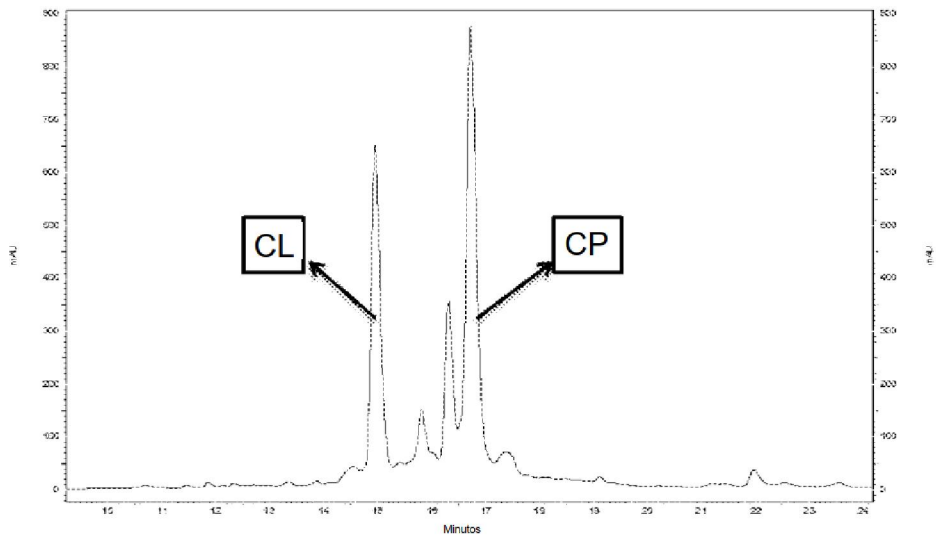
Se añadieron 400 ml de CI solubilizados y reducidos a alrededor de 9,5 l de tampón de replegamiento (arginina 0,6 M, sorbitol al 5 %, Tris 50 mM) a 5-10 °C en 1 h a caudal constante, el pH del tampón de replegamiento se ajustó a 10,5 a 10,6. El replegamiento en estas condiciones se continuó durante aproximadamente 4 a 5 h y a continuación el pH de la solución de replegamiento se ajustó a 9 con HCl 6 N. La temperatura de replegamiento se incrementó a 21-25 °C y el replegamiento continuó hasta 21-22 h. El perfil de RP-HPLC del replegamiento se muestra en la figura 8.

30

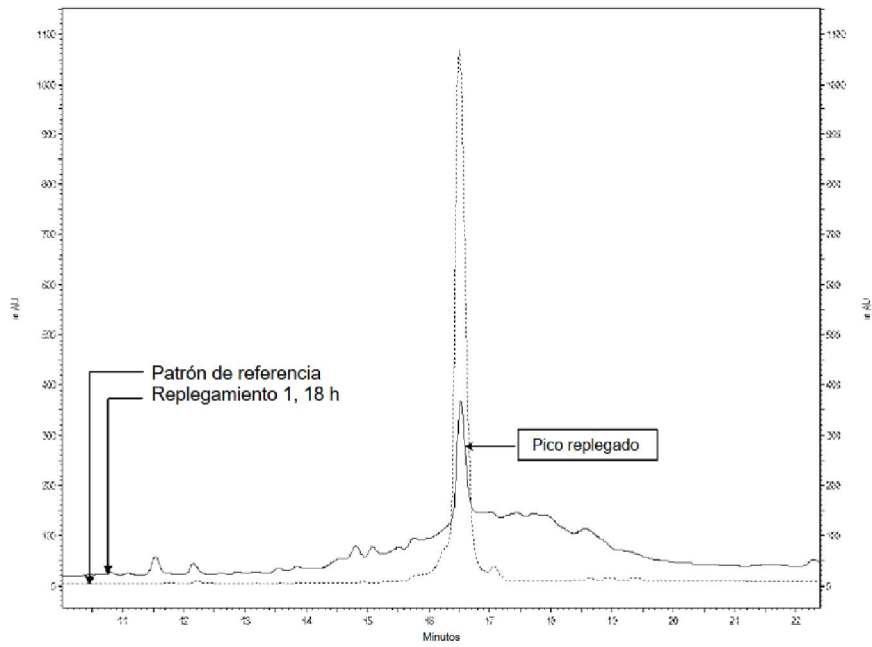
35

**REIVINDICACIONES**

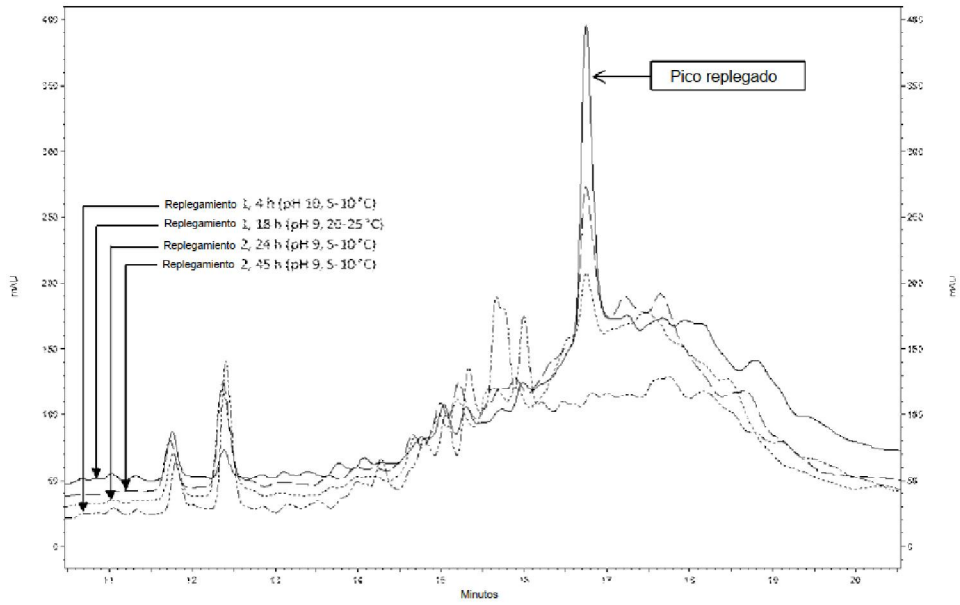
1. Un proceso para recuperar ranibizumab replegado, comprendiendo el proceso las etapas de:
- 5 a) aislar cuerpos de inclusión que comprenden una cadena ligera y una cadena pesada de ranibizumab de la célula hospedadora bacteriana;
- b) solubilizar dichos cuerpos de inclusión que comprenden una cadena ligera y/o cadena pesada de ranibizumab en una primera solución tamponada que comprende Tris-Cl 10 mM a 60 mM, urea 6 M a 8 M y DTT a un pH en el intervalo de 8,5 a 10;
- 10 c) replegar la cadena ligera y la cadena pesada solubilizada de ranibizumab en una segunda solución tampón que comprende arginina 0,1 M a 1 M, sorbitol al 1 % al 8 % y Tris 10 mM a 60 mM que tiene un pH en el intervalo de 10 a 11 y una temperatura en el intervalo de 4 °C a 12 °C durante un primer período de incubación de 1 a 25 horas y a continuación cambiar el pH y la temperatura del primer período de incubación a un pH en el intervalo de 8 a 9 y una temperatura en el intervalo de 20 °C a 30 °C durante un segundo período de incubación de 1 a 25
- 15 horas; y
- d) recuperar dicho ranibizumab replegado.
2. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde la segunda solución tampón de la etapa (c) se mantiene a pH 10 durante el primer periodo de incubación.
- 20 3. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde la segunda solución tampón de la etapa (c) se mantiene a una temperatura en el intervalo de 5 °C a 10 °C durante el primer periodo de incubación.
4. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde el primer periodo de incubación es de 4 horas.
- 25 5. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde la segunda solución tampón de la etapa (c) se mantiene a pH 9 durante el segundo periodo de incubación.
6. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde la segunda solución tampón de la etapa (c) se mantiene a una temperatura de 20 °C a aproximadamente 25 °C durante el segundo periodo de incubación.
- 30 7. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde el segundo periodo de incubación es de 14 horas.
8. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde la primera solución tampón de la etapa (b) se mantiene a pH 9.
- 35 9. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde el ranibizumab replegado se purifica adicionalmente por cromatografía aniónica o catiónica.



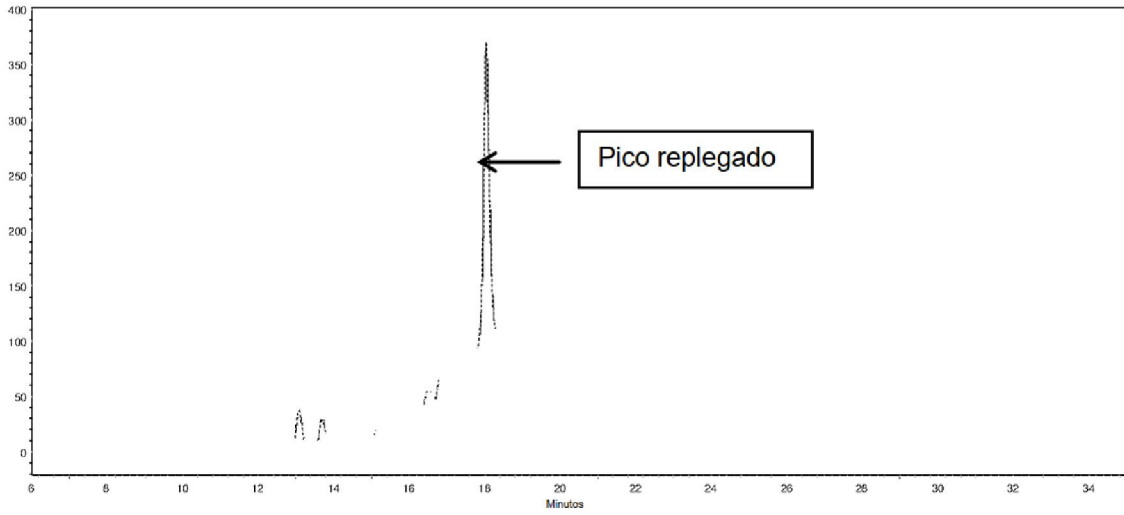
**Figura 1:** Perfil de RP-HPLC de CI solubilizados y reducidos



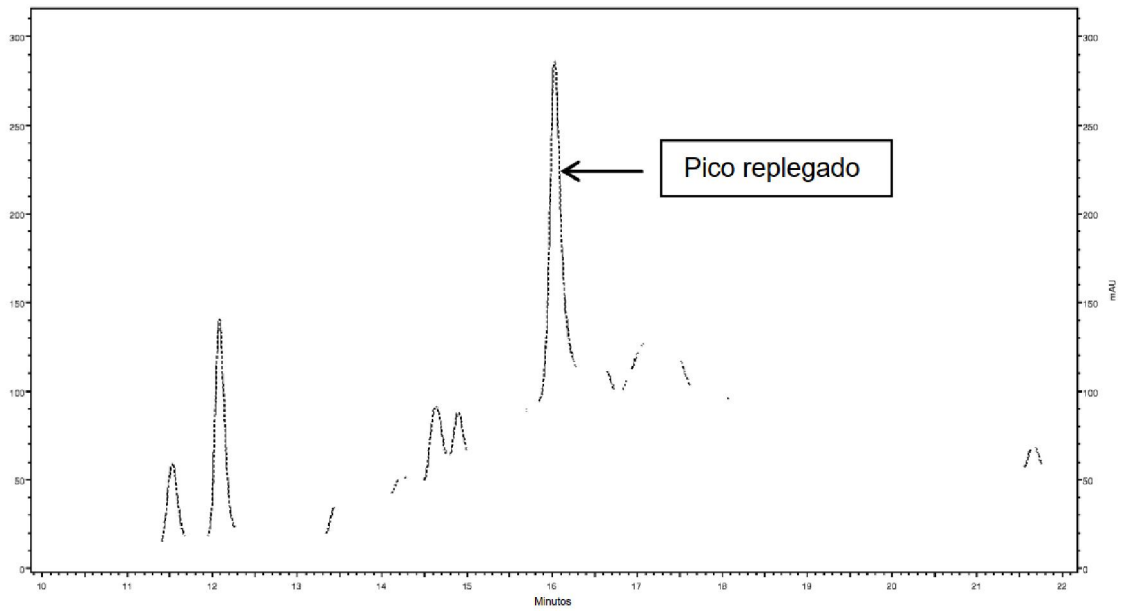
**Figura 2:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento 1 a las 18 h y patrón de referencia



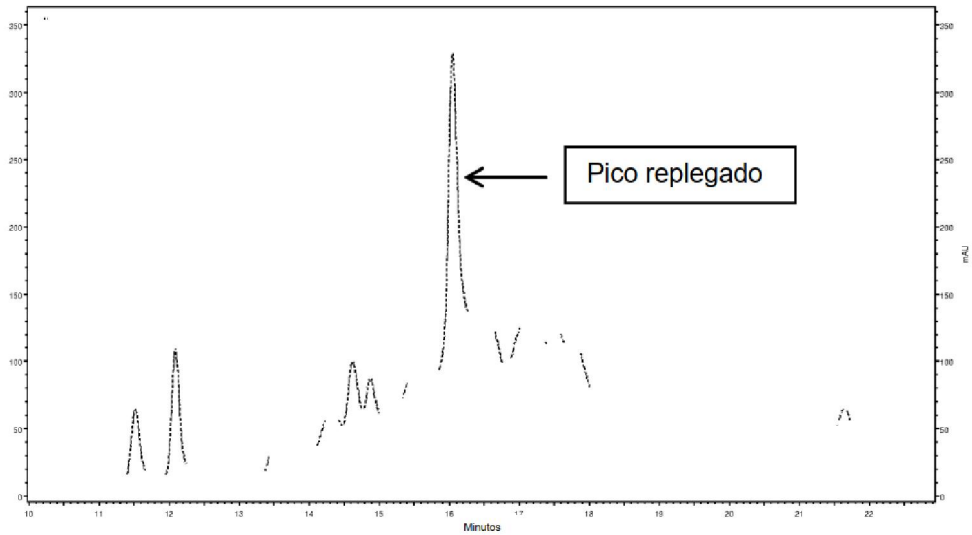
**Figura 3:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento 1 y 2 en diferentes puntos temporales



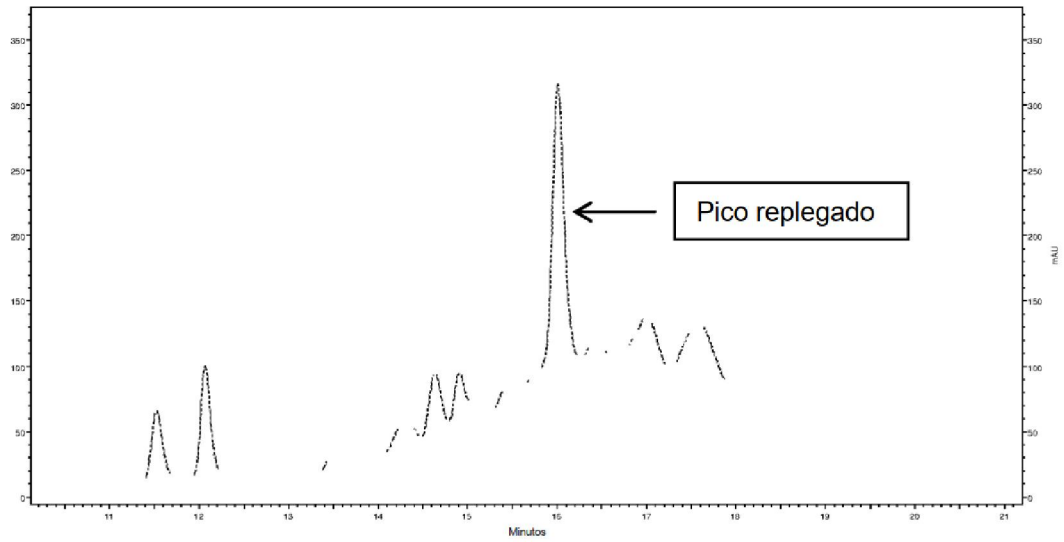
**Figura 4:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento



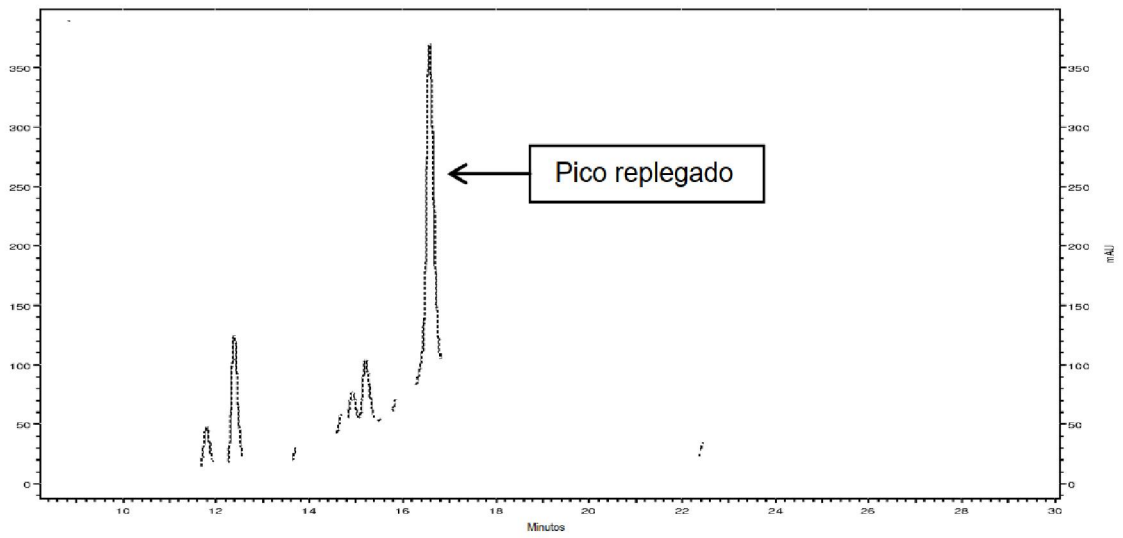
**Figura 5:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 8,7



**Figura 6:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 9,0



**Figura 7:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento, el pH del replegamiento se ajustó a 9,3



**Figura 8:** Perfil de RP-HPLC del replegamiento