

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 834 967**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2011** **PCT/EP2011/062837**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012** **WO12013682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2011** **E 11736364 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020** **EP 2598514**

54 Título: **Purificación de proteínas**

30 Prioridad:

27.07.2010 GB 201012603

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

21.06.2021

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

SPITALI, MARIANGELA;
SYMMONS, JONATHAN;
WHITCOMBE, RICHARD y
PEARCE-HIGGINS, MARK ROBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 834 967 T3

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

DESCRIPCIÓN

Purificación de proteínas

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la purificación de proteínas. Más específicamente, se refiere a un procedimiento para la purificación de fragmentos Z de anticuerpos tal y como se define en las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se da a conocer solo a título informativo.

Antecedentes de la invención

10 La purificación rentable de proteínas a gran escala es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas se producen mediante cultivo celular, con el uso de líneas celulares de mamíferos o bacterias manipuladas genéticamente para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen de dicha proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento. La proteína de interés debe aislarse de la mezcla de compuestos con los que se alimentan las células y de los subproductos de las propias células (corriente de alimentación) hasta lograr una pureza suficiente para su uso como tratamiento para los humanos. Los estándares establecidos por las autoridades sanitarias para las proteínas destinadas a la administración a los humanos con respecto a las impurezas de la corriente de alimentación son muy altos. Muchos métodos de purificación de proteínas conocidos en la técnica contienen etapas que requieren la aplicación, p. ej., de pH bajo o alto, alta concentración de sales u otras condiciones extremas que puedan comprometer irreversiblemente la actividad biológica de la proteína a purificar y, por tanto, no son los idóneos. Así pues, la separación de la proteína deseada con suficiente pureza plantea un desafío formidable. Históricamente, los esquemas de purificación de proteínas se han basado en las diferencias de las propiedades moleculares de tamaño, carga y solubilidad entre la proteína que se va a purificar y los contaminantes proteicos no deseados. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía de intercambio iónico, la precipitación diferencial y similares.

25 Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo tienen una importancia creciente en una serie de áreas terapéuticas. Uno de los métodos más importantes para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos es la tecnología recombinante. Tales técnicas usan una célula hospedadora para expresar el anticuerpo deseado, o un fragmento de anticuerpo, que luego se separa del medio de producción y se purifica.

30 Los anticuerpos requieren la glucosilación y, por lo tanto, se suelen expresar en sistemas de expresión eucariotas que emplean células eucariotas, en concreto las células de mamífero tales como las células CHO, PER.C6, NS0, BHK o Sp2/0. En los sistemas de expresión eucariotas, la proteína de interés expresada, tal como un anticuerpo, se suele secretar al medio de cultivo de las células. Posteriormente, el medio puede separarse con facilidad de las células secretoras de la proteína, p. ej., por centrifugación o filtración.

35 Casi todas las plataformas industriales de purificación de anticuerpos actuales utilizan la proteína A (descrita, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 98/23645). La proteína A es una proteína de la superficie celular que se encuentra en la pared celular de las bacterias *Staphylococcus aureus* que se fija a la porción Fc de las inmunoglobulinas de mamíferos. La proteína A tiene una alta afinidad por la IgG₁ e IgG₂ de humano y una afinidad moderada por los anticuerpos de tipo IgM, IgA e IgE de los humanos. En consecuencia, la purificación con la proteína A no es adecuada para los fragmentos de anticuerpo que carecen de la porción Fc.

40 Una proteína que no requiere ninguna glucosilación se expresa preferiblemente en los sistemas de expresión procariotas que emplean células procariotas, tales como las bacterias gramnegativas. En concreto, un anticuerpo que no necesita ninguna glucosilación, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal como un Fab, un Fab' o un scFv, se expresa preferiblemente en tales sistemas. Los sistemas de expresión procariotas y en concreto los sistemas de *Escherichia coli* (*E. coli*) u otras bacterias gramnegativas permiten la fabricación de proteínas que no requieren ninguna glucosilación, tal como, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo, de una forma atractiva por su rentabilidad. La fabricación de proteínas en *E. coli* es beneficiosa sobre todo debido al menor coste de fungibles y a la mayor rapidez en los procedimientos de desarrollo de fármacos (Humphreys, 2003; Humphreys, 2003). Los sistemas procariotas y, en concreto, los sistemas de expresión de proteínas en *E. coli* se conocen bien en la técnica (Swartz, 2001; Jana y Deb, 2005; Terpe, 2006). Las células procariotas no secretan activamente una proteína heteróloga de interés que se expresa en la célula. Sin embargo, las células procariotas gramnegativas, tales como *E. coli*, se pueden manipular genéticamente de manera que las proteínas heterólogas expresadas en la célula, tal como los fragmentos de anticuerpo, se exporten al espacio periplásmico donde pueden formar puentes disulfuro. El aislamiento de estas proteínas heterólogas a partir del espacio periplásmico requiere la rotura de la membrana externa de las células procariotas, lo que da como resultado que se libere una cantidad sustancial de proteínas de la célula hospedadora (PCH). Los métodos para romper la membrana externa de una célula procariota gramnegativa y la posterior recogida del fluido del cultivo celular que contiene el heterólogo se conocen bien en la técnica. La fabricación de fragmentos de anticuerpo en *E. coli* también da lugar a la producción de subproductos, tales como cadenas ligeras truncadas, aductos de glutatión de las cadenas ligeras y dímeros de cadenas ligeras (Battersby et al., 2001).

El fluido de cultivo celular (corriente de alimentación) recogido de los sistemas de expresión procariotas, tales como los sistemas de expresión en *E. coli*, y, en concreto, el extracto celular del periplasma procedente de bacterias gramnegativas difiere sustancialmente del fluido del cultivo celular recogido de los sistemas de expresión eucariotas en la cantidad relativa y en la composición de las PCH, del ADN bacteriano y de las endotoxinas que hay que separar de la proteína heteróloga de interés que está expresada en el sistema de expresión procariota o eucariota. La concentración de las PCH, así como la complejidad y heterogeneidad de las PCH, depende del sistema de expresión o de la línea celular y de las condiciones del cultivo de las células (Arunakumari, 2009). La purificación de fragmentos de anticuerpo expresados en los sistemas de expresión procariotas, en concreto en los sistemas de expresión de procariotas gramnegativos, se enfrenta a, por lo tanto, un conjunto diferente de desafíos y requiere estrategias diferentes (Humphreys y Glover, 2001). En la técnica se conocen los principios básicos de la purificación de fragmentos de anticuerpos monoclonales (Spitali, 2009). Hay dos medicamentos autorizados en la actualidad por la Agencia Federal de Fármacos y Alimentos de los EE. UU. (FDA por su nombre en inglés) y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por su nombre en inglés) que comprenden un fragmento de anticuerpo como ingrediente activo, y que se produce en las células microbianas: el certolizumab pegol (Cimzia®) comprende un Fab que se fija específicamente al TNF α , y el ranibizumab (Lucentis®) es un fragmento Fab que se fija específicamente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por su nombre en inglés). La purificación del ranibizumab a partir de la corriente de alimentación microbiana se realiza mediante un procedimiento con cuatro etapas de cromatografía (Walsh, 2007). El medicamento abciximab (ReoPro®) comprende el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino 7E3 que se fija al receptor de la glucoproteína (GP) IIb/IIIa de las plaquetas humanas e inhibe la agregación plaquetaria. El anticuerpo quimérico 7E3 se produce mediante la perfusión continua en el cultivo de células de mamífero. El fragmento Fab de 48 kDa se obtiene del anticuerpo completo purificado después de la digestión con papaína y la cromatografía en columna.

La cromatografía de afinidad separa las proteínas sobre la base de una interacción reversible entre una proteína (o grupo de proteínas) de interés y un ligando específico acoplado a una matriz cromatográfica. La interacción entre la proteína de interés y el ligando acoplado a la matriz de la cromatografía puede ser el resultado de interacciones electrostáticas o hidrófobas, fuerzas de van der Waals y/o puentes de hidrógeno. Para eluir la molécula deseada del medio de afinidad, la interacción se puede revertir, ya sea de manera específica con un ligando competitivo, o de manera inespecífica al cambiar el pH, la fuerza iónica o la polaridad. La purificación por afinidad requiere que un ligando bioespecífico pueda unirse covalentemente a una matriz cromatográfica. El ligando acoplado debe conservar su afinidad de fijación específica por las moléculas deseadas y, después de eliminar por lavado el material sin fijar, la fijación entre el ligando y la molécula diana debe ser reversible para permitir que las moléculas deseadas se retiren en su forma activa. A pesar de que se use con frecuencia, la cromatografía de afinidad es costosa, sobre todo a la escala industrial necesaria para purificar las proteínas terapéuticas.

La cromatografía de intercambio iónico se puede utilizar para purificar las moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas se separan sobre la base de la interacción electrostática inespecífica de sus grupos cargados con moléculas con la carga opuesta unidas a la matriz de soporte de la fase sólida, con lo que se retrasan las moléculas ionizadas que interaccionan con más fuerza con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de molécula ionizada, y su afinidad por la matriz, varía según el número de grupos cargados, la carga de cada grupo y la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz en fase sólida cargada. Estas diferencias dan como resultado la resolución de varios tipos de moléculas mediante cromatografía de intercambio iónico. La elución de las moléculas que están fijadas a la fase sólida se suele lograr con el aumento de la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Un cambio de pH y, gracias a ello, la alteración de la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio de conductividad o de pH puede ser gradual (elución en gradiente) o discontinuo (elución escalonada). Se conocen dos tipos generales de interacción: cromatografía de intercambio aniónico mediada por cadenas laterales de aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico) que interaccionan con las superficies cargadas positivamente, y cromatografía de intercambio catiónico mediada por restos de aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, lisina y arginina) que interaccionan con las superficies cargadas negativamente. Los intercambiadores de aniones pueden clasificarse como débiles o fuertes. El grupo con carga en un intercambiador de aniones débil es una base débil, que se desprotona y, por lo tanto, pierde su carga a pH alto. La dietilaminoetil (DEAE)-celulosa es un ejemplo de un intercambiador de aniones débil, en el que el grupo amino puede tener carga positiva por debajo de un pH ~ 9 y pierde gradualmente su carga a valores de pH más altos. La DEAE o el dietil-(2-hidroxipropil)aminoetil (QAE) tienen cloruro como contraión, por ejemplo.

Una alternativa a la elución mediante el incremento de la fuerza iónica del tampón de elución (cromatografía de elución) es la elución con moléculas que tienen una mayor afinidad dinámica por la fase estacionaria que por la proteína fijada. Este modo de realizar la cromatografía de intercambio iónico se denomina cromatografía de desplazamiento. La cromatografía de desplazamiento es fundamentalmente diferente de cualquier otro modo de cromatografía en que los solutos no se desorben en el modificador de la fase móvil y se separan por diferencias en la velocidad de migración (Tugcu, 2008). En el desplazamiento, las moléculas se ven obligadas a migrar hacia abajo por la columna cromatográfica mediante el avance de una onda de choque de una molécula desplazadora que tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria que por cualquier componente de la corriente de alimentación. Es esta migración forzada la que da como resultado concentraciones y purezas del producto más altas en comparación con otros modos de operación de alta retención, seguida de una infusión constante de una solución del desplazador en la columna.

La capacidad de fijación dinámica describe la cantidad de la proteína de interés que se fijará a una resina cromatográfica en una columna en las condiciones de flujo definidas. La capacidad de fijación dinámica de una resina de cromatografía depende de las condiciones de funcionamiento (por ejemplo, velocidad de flujo, pH y conductividad), del origen de la muestra, de la preparación de la muestra y de otras impurezas de fijación que estén presentes. La capacidad de fijación dinámica se determina con la carga de una muestra que contiene una concentración conocida de la proteína de interés y el seguimiento de la concentración en el flujo continuo de la columna (Do et al., 2008). La capacidad de fijación dinámica de una resina de intercambio iónico se define como el punto durante la carga en el que la proteína de interés comienza a recuperarse en el flujo continuo. Típicamente, se utiliza un valor del 10 % para la proporción de la proteína de interés en el flujo continuo en comparación con la carga para definir este punto (McCue et al., 2003). Para la retirada de las impurezas, el umbral de impurezas en el flujo continuo se establece de acuerdo con los criterios específicos de la aplicación.

Las solicitudes de patente internacional WO 99/57134, WO 2004/024866 y WO 2007/117490 se refieren a procedimientos para la purificación de proteínas o de anticuerpos que comprenden la cromatografía de intercambio iónico. Los procedimientos se ilustran con el uso de anticuerpos producidos en las células de mamíferos. La solicitud de patente internacional WO 2009/058812 se refiere a un procedimiento para la purificación de anticuerpos que comprende la cromatografía de intercambio catiónico. El procedimiento se ilustra con el uso de anticuerpos producidos en las células de mamífero. La solicitud de patente internacional WO 2007/108955 se refiere a un procedimiento de cromatografía de intercambio iónico sin afinidad de dos etapas para la purificación de proteínas que comprende la cromatografía de intercambio catiónico seguida de la cromatografía de intercambio iónico. El ejemplo de la solicitud de patente internacional WO 2007/108955 describe la purificación de anticuerpos completamente humanos producidos en las células de mamíferos. Se realizaron múltiples etapas de lavado durante la cromatografía de intercambio catiónico y el eluido se diluyó antes de la cromatografía de intercambio aniónico. Humphreys et al. describen la purificación de Fab' a la escala de laboratorio con el uso de la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio iónico (Humphreys et al., 2004). La solicitud de patente internacional WO 2004/035792 se refiere a la generación de cepas de *E. coli* que expresan la proteína PhoS mutante con el fin de reducir las impurezas de la proteína PhoS en las preparaciones de fragmentos de anticuerpo purificadas a partir de cultivos de células bacterianas.

El CDP870 es un fragmento de anticuerpo modificado genéticamente (Fab') unido químicamente a un resto de PEG tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 01/94585. El CDP870 tiene propiedades neutralizantes del TNF α humano potentes.

En la técnica existe una necesidad de métodos para purificar fragmentos de anticuerpo a partir de fluidos del cultivo de células recogidos de bacterias procariotas y, en concreto, gramnegativas, tales como los sistemas de expresión en *E. coli*. En la técnica existe una necesidad particular de métodos para purificar fragmentos de anticuerpo a partir de extractos celulares de periplasma recogidos de bacterias procariotas y, en concreto, gramnegativas, tales como los sistemas de expresión en *E. coli* que son idóneos para operar con los extractos de células que contienen un título muy alto del fragmento de anticuerpo o de PCH o tanto del fragmento de anticuerpo como de las PCH. La expresión de títulos altos de los fragmentos de anticuerpo requiere métodos idóneos para la purificación de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpo de manera rentable: la reducción del tamaño de las columnas, el uso de tampones y la duración del procedimiento (registro de datos de GE Healthcare 11-0025-76 AE, 2007).

Compendio de la invención

Los requisitos de purificación y los desafíos difieren sustancialmente para las proteínas que se han purificado del cultivo de células bacterianas y para las proteínas que deben purificarse del cultivo de células eucariotas. Hay que afrontar determinadas dificultades cuando hay que purificar las proteínas a partir de extractos celulares del periplasma procedente de bacterias gramnegativas debido a, p. ej., la cantidad de proteínas bacterianas de las células hospedadoras que están presentes. Deben superarse otras dificultades cuando es necesario purificar las proteínas a partir de cultivos de bacterias gramnegativas que expresan las proteínas heterólogas a una concentración muy alta.

Los inventores han encontrado sorprendentemente un nuevo procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo a partir de un extracto celular del periplasma, en el que el procedimiento es muy eficaz e idóneo para el extracto celular del periplasma que comprende el fragmento de anticuerpo a una concentración elevada.

En un aspecto, la invención da a conocer un procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo desde un extracto celular del periplasma, que comprende una primera etapa de cromatografía para capturar el fragmento de anticuerpo, en donde una mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo se somete a una cromatografía de intercambio catiónico y posteriormente se eluye para producir un primer eluido que contiene el fragmento de anticuerpo; y una segunda etapa de cromatografía en la que el primer eluido se somete a una cromatografía de intercambio aniónico para capturar las impurezas y producir un flujo continuo que contiene el fragmento de anticuerpo, y recuperar dicho fragmento de anticuerpo, en donde el procedimiento comprende no más de dos etapas de cromatografía.

En otro aspecto, la invención da a conocer un procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo a partir de un extracto celular del periplasma, que consiste esencialmente en una primera etapa de cromatografía para capturar el fragmento de anticuerpo, en la que una mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo se somete a una

cromatografía de intercambio catiónico para posteriormente eluirla para producir un primer eluido que contiene el fragmento de anticuerpo; se aplica una primera ultrafiltración al primer eluido; una segunda etapa de cromatografía en la que el primer eluido purificado se somete a una cromatografía de intercambio aniónico para capturar las impurezas y producir un flujo continuo que contiene el fragmento de anticuerpo; y una segunda ultrafiltración aplicada al flujo continuo, y la recuperación de dicho fragmento de anticuerpo.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra un cromatograma de proteínas (que incluye el Fab') en función de la absorbancia de luz UV [medida en miliunidades de absorbancia (mAU)] (línea continua) junto con la conductividad (línea de puntos) desde el primer paso de captura en una columna de cromatografía de intercambio catiónico (Capto S™). En el cromatograma se muestra que se puede cargar un gran volumen en la columna durante lo cual algunas proteínas no se fijan, seguido de la recuperación de las proteínas fijadas, incluido el Fab', en un volumen pequeño con un incremento de la conductividad.

En la figura 2 se muestra un cromatograma desde la etapa en una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Capto Q™). En el cromatograma se muestra que un Fab' no se fija a ella y su aparición en el lavado posterior a la carga con las impurezas fijadas que se recuperan en el pico de regeneración.

En la figura 3 se muestra un análisis de SDS-PAGE de la carga de captura, el eluido de captura y el flujo continuo del intercambio aniónico.

En la figura 4 se muestra una inmunotransferencia de tipo Western para detectar las proteínas de la célula hospedadora presentes en la muestra antes (carril 2) y después (carril 3) de la cromatografía de intercambio aniónico.

En la figura 5 se muestra la secuencia de aminoácidos de CDP870.

Breve descripción de las secuencias

En la SEQ ID n.º 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 2 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 4 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL1 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 5 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL2 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 6 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL3 de CDP870.

En la SEQ ID n.º 7 se muestra la secuencia de nucleótidos y la predicha de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de CDP870.

En la SEQ ID n.º 8 se muestra la secuencia de nucleótidos y la predicha de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de CDP870.

En la SEQ ID n.º 9 se muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del Fab de CDP870 con injerto anti-TNFα.

En la SEQ ID n.º 10 se muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del Fab de CDP870 con injerto anti-TNFα.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo a partir de un extracto celular del periplasma, que comprende una primera etapa de cromatografía para capturar el fragmento de anticuerpo, en el que una mezcla, tal como un extracto celular del periplasma, que contiene un fragmento de anticuerpo, se somete a una cromatografía de intercambio catiónico y posteriormente se eluye para producir un primer eluido que contiene el fragmento de anticuerpo; y una segunda etapa de cromatografía en la que el primer eluido se somete a una cromatografía de intercambio aniónico para capturar las impurezas y producir un flujo continuo que contiene el fragmento de anticuerpo, y recuperar dicho fragmento de anticuerpo, en donde el procedimiento comprende no más de dos etapas de cromatografía.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo a partir de un extracto celular del periplasma que consiste esencialmente en una primera etapa de cromatografía para capturar el fragmento de anticuerpo, en el que una mezcla, tal como un extracto celular del periplasma que contiene un fragmento de anticuerpo, se somete a cromatografía de intercambio catiónico para eluir posteriormente y producir un primer eluido que contiene el fragmento de anticuerpo; una primera ultrafiltración aplicada al primer eluido; una segunda etapa de cromatografía en la que el primer eluido purificado se somete a una cromatografía de intercambio aniónico para capturar impurezas y producir un flujo continuo que contiene el fragmento de anticuerpo; y una segunda ultrafiltración aplicada al flujo continuo, y la recuperación de dicho fragmento de anticuerpo.

En una primera realización del primer aspecto de la invención, el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprende solo dos etapas de cromatografía.

5 En una primera realización del segundo aspecto de la invención, el procedimiento según el segundo aspecto de la invención, la ultrafiltración después de la cromatografía de intercambio catiónico y la ultrafiltración después de la cromatografía de intercambio aniónico se realizan mediante la filtración de flujo tangencial (FFT).

En una segunda realización del primer o segundo aspecto de la invención, en el procedimiento de acuerdo con la primera realización del primer o segundo aspecto de la invención, todas las etapas de cromatografía se realizan en una columna de cromatografía.

10 En una tercera realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la primera o la segunda realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio catiónico de la primera etapa de cromatografía se realiza en modo de elución.

En una cuarta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la segunda o tercera realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio catiónico del primer paso de cromatografía comprende los siguientes pasos en orden secuencial:

- 15 a) cargar una mezcla, tal como un extracto celular del periplasma, que contiene un fragmento de anticuerpo en la columna de intercambio catiónico,
- b) lavar la columna de intercambio catiónico con un tampón de lavado en el que durante el lavado no se modifique la conductividad, el pH y la concentración de sales del tampón de lavado, y
- c) eluir el fragmento de anticuerpo con un tampón de elución.

20 En una quinta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la cuarta realización del primer o segundo aspecto de la invención, el pH del tampón de lavado es idéntico al pH de la mezcla, tal como un extracto celular del periplasma, que contiene un fragmento de anticuerpo, antes del primer paso de cromatografía.

25 En una sexta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta realización del primer o segundo aspecto de la invención, la mezcla, tal como un extracto celular del periplasma, que contiene un fragmento de anticuerpo, antes de la primera etapa de cromatografía, tiene un pH comprendido entre 4,0 y 5,0, preferiblemente un pH comprendido entre 4,3 y 4,7, más preferiblemente un pH comprendido entre 4,3 y 4,5, y lo más preferiblemente de 4,5.

30 En una séptima realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta realización del primer o segundo aspecto de la invención, la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo y que se somete a una cromatografía de intercambio catiónico como paso de captura principal contiene la proteína total a una concentración de al menos 1,5 g/l, o al menos 3 g/l, o al menos 4 g/l, o al menos 5 g/l, o al menos 7,5 g/l, o al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l, o al menos 40 g/l, o a una concentración comprendida entre 3 y 40 g/l, o a una concentración comprendida entre 4 y 20 g/l, o a una concentración comprendida entre 5 y 15 g/l.

35 En una octava realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta o séptima realización del primer o segundo aspecto de la invención, la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo y que está sometida a una cromatografía de intercambio catiónico como paso de captura principal contiene el fragmento de anticuerpo a una concentración de al menos 3 g/l, o al menos 4 g/l, o al menos 5 g/l, o al menos 7,5 g/l, o al menos al menos 10 g/l, o al menos 20 g/l, o a una concentración comprendida entre 3 y 20 g/l, o a una concentración comprendida entre 4 y 50 g/l, o a una concentración comprendida entre 5 y 10 g/l.

40 En una novena realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima u octava realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa de captura principal se realiza a una velocidad de flujo de al menos 300 cm/h, preferiblemente entre 300 y 2000 cm/h, más preferiblemente, entre 350 y 1500 cm/h, incluso más preferiblemente entre 350 y 1000 cm/h, y lo más preferiblemente entre 400 y 700 cm/h.

45 En una décima realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava o novena realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa de captura principal se realiza a una conductividad de no más de 6 mS/cm, preferiblemente entre 6 y 2 mS/cm, más preferiblemente entre 5 y 3 mS/cm, e incluso más preferiblemente entre 4,5 y 3,5 mS/cm.

50 En una undécima realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena o décima realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa de captura principal se realiza en una resina que comprende sulfonilo, sulfopropilo o carboximetilo acoplado a una resina de material idóneo conocido en la

técnica, que incluye, pero sin limitación, agarosa en forma de perlas reticuladas (por ejemplo, Sepharose™ o Superose™), polímeros de metacrilato modificado (por ejemplo, tentáculo, hidroxilados); sílice; divinilbenceno cerámico y de estireno.

- 5 En una duodécima realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la undécima realización del primer o segundo aspecto de la invención, la resina de la cromatografía de intercambio catiónico de la captura principal tiene una capacidad de fijación dinámica para el fragmento de anticuerpo de al menos 50 g/l de resina, o al menos 60 g/l de resina, o al menos 75 g/l de resina, o al menos 150 g/l de resina, o entre 50 y 150 g/l de resina, o entre 60 y 100 g/l de resina, o entre 50 y 75 g/l de resina.
- 10 En una decimotercera realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la undécima o duodécima realización del primer o segundo aspecto de la invención, la resina de la cromatografía de intercambio catiónico de la captura principal tiene un tamaño medio de las partículas de al menos 50 µm, preferiblemente entre 60 y 300 µm, más preferiblemente entre 70 y 200 µm, e incluso más preferiblemente entre 80 y 100 µm.
- 15 En una decimocuarta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima o decimotercera realización del primer o segundo aspecto de la invención, la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo que se somete a la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa de captura principal contiene la proteína de la células hospedadoras bacterianas en una cantidad comprendida entre aproximadamente 200 µg/ml y 10 000 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml a 5 000 µg/ml, aproximadamente 1 000 µg/ml a 4 000 µg/ml, o aproximadamente 2000 µg/ml a 4 000 µg/ml.
- 20 En una decimoquinta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera o decimocuarta realización del primer o segundo aspecto de la invención, en la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa de captura principal se cargan entre 5 y 100 g de fragmento de anticuerpo por litro de resina, entre 10 y 90 g de fragmento de anticuerpo por litro de resina, o entre 20 y 75 g de fragmento de anticuerpo por litro de resina.
- 25 En una decimosexta realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta o decimoquinta realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio aniónico en el segundo paso de cromatografía se realiza en una resina que comprende amonio cuaternario (Q), dietilaminoetilo (DEAE) o trimetilaminoetilo (TMAE) acoplado a una resina de material idóneo conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a ellas, agarosa en formas de perlas reticuladas (por ejemplo, Sepharose™ o Superose™), polímeros de metacrilato modificado (por ejemplo, tentáculo, hidroxilado); sílice; divinilbenceno cerámico y de estireno. La segunda etapa de cromatografía también se puede realizar en una membrana que comprende un amonio cuaternario o poli(alilamina) acoplado a una membrana de material idóneo conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a ellos, celulosa y polietileno.
- 30 En una decimoséptima realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta o decimosexta realización del primer o segundo aspecto de la invención, la columna de cromatografía de intercambio aniónico en la segunda etapa de cromatografía tiene un tamaño medio de partícula de al menos 50 µm, preferiblemente entre 60 y 300 µm, y más preferiblemente entre 70 y 200 µm, e incluso más preferiblemente entre 80 y 100 µm.
- 35 En una decimooctava realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento según la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta o decimoséptima realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio aniónico en la segunda etapa de cromatografía se realiza a un pH comprendido entre 6 y 10, preferiblemente un pH comprendido entre 7 y 9, más preferiblemente comprendido entre 8 y 9, e incluso más preferiblemente a un pH de 8,5.
- 40 En una decimonovena realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima o decimooctava realización del primer o segundo aspecto de la invención, la cromatografía de intercambio aniónico en la segunda etapa de cromatografía tiene una capacidad de fijación para las impurezas relacionadas con el procedimiento de más de 20 g/l de resina, preferiblemente mayor de 30 g/l de resina, e incluso más preferiblemente más de 40 g/l de resina, o entre 20 y 80 g/l de resina, o entre 20 y 40 g/l de resina.
- 45 En una vigésima realización del primer o segundo aspecto de la invención, el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimooctava o decimonovena realización del primer o segundo aspecto de la invención no comprende una etapa de filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR).
- 50
- 55

En una vigésima primera realización del primer o segundo aspecto de la invención en el procedimiento de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimooctava, decimonovena o vigésima realización del primer o segundo aspecto de la invención, el fragmento de anticuerpo recuperado contiene las proteínas de la célula hospedadora (PCH) en una cantidad de no más de 150 partes por millón (ppm), o no más de 120 ppm o no más de 100 ppm.

En otras realizaciones, el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer o segundo aspecto de la invención en el que el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, un scFv o un anticuerpo de camélido.

El término "cromatografía de afinidad", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína de interés o un anticuerpo de interés se fija de manera reversible y específica a un ligando bioespecífico. Preferiblemente, el ligando bioespecífico está unido covalentemente a un material de la fase sólida cromatográfica y es accesible a la proteína de interés en solución cuando la solución entra en contacto con el material de la fase sólida cromatográfica. La proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo) conserva su afinidad de fijación específica por el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas de la mezcla no se fijan de manera apreciable o específicamente al ligando. La fijación de la proteína de interés al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o las impurezas proteicas pasen a través del medio cromatográfico mientras que la proteína de interés permanece fijada específicamente al ligando inmovilizado en el material de la fase sólida. A continuación, la proteína de interés fijada específicamente se elimina en su forma activa del ligando inmovilizado con pH bajo, pH alto, alto contenido de sal, ligando competidor y similares, y se pasa a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de proteínas contaminantes o impurezas proteicas que antes se dejaron pasar al principio a través de la columna. Se puede usar cualquier sustancia como ligando para purificar su correspondiente proteína de fijación específica, p. ej., anticuerpo.

Los términos "aglicosilado" y "no glucosilado" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a la falta de adición postraduccional específica de un resto de glucosilo o de glúcido a una proteína, tal como un anticuerpo.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal y como se usan en la presente memoria, se refiere a anticuerpos tetraméricos completos monoclonales o policlonales que comprenden dos cadenas pesadas y dos ligeras. El término inmunoglobulina o inmunoglobulinas se usa como sinónimo de "anticuerpo" o "anticuerpos", respectivamente. El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal y como se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a ellos, los anticuerpos recombinantes que se generan mediante las tecnologías recombinantes como se conoce en la técnica. Un "anticuerpo" o "anticuerpos" puede ser de cualquier origen, que incluye desde especies de mamíferos tal como humanos, primates no humanos (por ejemplo, humanos tal como chimpancés, babuinos, rhesus o macacos cangrejeros), roedores (por ejemplo, de ratones, ratas, conejos o conejillo de indias), especie caprina, bovina o equina. El anticuerpo de la presente memoria está dirigido contra un "antígeno" de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos. Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento o una citocina. Las dianas moleculares preferidas para los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen los polipéptidos CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD40 y CD40-L; FcRN; OX40; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor del EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3, incluidas las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11 α , anti-CD18 o anti-CD11b); quimiocinas y citocinas o sus receptores, tales como IL-1 α y β , IL-2, IL-6, el receptor de IL-6, formas de IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, TNF α y TNF β ; factores de crecimiento como el VEGF; IgE; antígenos de los grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor de mpl; CTLA-4; polipéptido C; etc.

El término "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo aglicosilado o una porción aglicosilada de un anticuerpo, generalmente la región de fijación al antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen cualquier anticuerpo que carece de la porción Fc o que no la tiene. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos también incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv; diacuerpos; triacuerpos; tetracuerpos; minicuerpos; anticuerpos que consisten esencialmente en uno, dos o tres dominios de inmunoglobulina, tales como Domain AntibodiesTM; anticuerpos monocatenarios; variantes biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas o multispecíficas de cualquiera de los anteriores. El término "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo", tal y como se usa en la presente memoria, también se refiere a los anticuerpos de camélidos (por ejemplo, de camellos o llamas, tales como NanobodiesTM) y derivados de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica (Holliger y Hudson, 2005). Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo y se conocen en este campo (Glover y Humphreys, 2004). El término "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria, comprende fragmentos de anticuerpos humanos, humanizados, primatizados y quiméricos.

El término "tampón", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia que, por su presencia en la solución, incrementa la cantidad de ácido o álcali que debe añadirse para provocar un cambio de una unidad en el pH.

Una solución tamponada resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes de ácido y base conjugados. Las soluciones tamponadas para ser usadas con reactivos biológicos son capaces, por lo general, de mantener una concentración constante de iones de hidrógeno de manera que el pH de la solución está dentro de un margen fisiológico. Los componentes tamponantes tradicionales incluyen, pero no se limitan a ellos, sales, ácidos y bases orgánicos e inorgánicos.

El término "cromatografía", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al procedimiento mediante el cual una sustancia de interés en una mezcla se separa de otras sustancias en una mezcla como resultado de las diferencias en la velocidad a la que cada uno de los solutos de la mezcla migra a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase en movimiento, o en procedimientos de fijación y elución.

El término "columna de cromatografía" o "columna" en relación con la cromatografía, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un recipiente, con frecuencia en forma de cilindro o pilar hueco, que se llena con la matriz o la resina de la cromatografía. La matriz o la resina de la cromatografía es el material que proporciona las propiedades físicas y/o químicas que se emplean para la purificación.

El término "conductividad", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad que tiene una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante el transporte de iones. Por lo tanto, con la presencia de una cantidad creciente de iones en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad más alta. La unidad de medida de la conductividad es milisiemens por centímetro (mS/cm) y se puede medir con un conductímetro. La conductividad de una solución se puede alterar al cambiar la concentración de los iones en ella. Por ejemplo, se puede alterar la concentración de un agente tamponante y/o la concentración de una sal (por ejemplo, NaCl o KCl) en la solución para lograr la conductividad deseada.

El término "eluido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición líquida que comprende la sustancia (por ejemplo, el fragmento de anticuerpo o la sustancia contaminante) que se obtuvo después de la fijación de dicha sustancia a un material cromatográfico y la adición de un tampón de elución para disociar la sustancia del material de la cromatografía. Se puede hacer referencia a los eluidos en relación con la etapa del procedimiento de purificación. Por ejemplo, el término "primer eluido" se refiere al eluido del primer paso cromatográfico; el término "segundo eluido" se refiere al eluido del segundo paso cromatográfico, etc.

El término "flujo continuo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición líquida que comprende la sustancia (por ejemplo, el fragmento de anticuerpo o la sustancia contaminante) que se obtuvo al hacer pasar una mezcla que comprende dicha sustancia sobre un material de cromatografía, de manera que la molécula pasa sobre el material sin unirse a él.

El término "mezcla", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición al menos parcialmente líquida que comprende al menos un fragmento de anticuerpo de interés que se desea purificar de otras sustancias que también pueden estar presentes. Las mezclas pueden ser, por ejemplo, suspensiones, soluciones acuosas, sistemas de solventes orgánicos o mezclas o soluciones de solventes acuosos u orgánicos. Las mezclas son a menudo mezclas o soluciones complejas que comprenden muchas moléculas biológicas (tales como proteínas, anticuerpos, hormonas y virus), moléculas pequeñas (tales como sales, azúcares, lípidos, etc.) e incluso partículas. Si bien una mezcla típica de origen biológico puede comenzar como una solución o suspensión acuosa, también puede contener los solventes orgánicos usados en etapas de separación anteriores, tales como precipitaciones, extracciones, y similares, de solventes.

El término "extracto celular del periplasma", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la composición obtenida de un cultivo celular de células procariotas gramnegativas después de la rotura de la membrana externa y la liberación de material del espacio periplásmico. Un extracto celular del periplasma suele ser líquido con frecuencia y también puede contener partículas o gas. El término "extracto celular del periplasma" también incluye una composición líquida que puede haber sido tratada adicionalmente después de la recogida del espacio periplásmico, p. ej., para retirar el material insoluble.

El término "purificación" o "que se purifica" o "purificado" se refiere a un procedimiento en el que a partir de una mezcla que contiene una proteína de interés, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se retiran o se reducen las sustancias no deseadas, tal como las PCH, ADN o sales. Una "etapa de purificación" puede formar parte de un procedimiento de purificación global que da como resultado una composición "homogénea", que se usa en la presente memoria para referirse a una composición que comprende menos de 150 ppm de PCH en una composición que comprende la proteína de interés, como alternativa menos de 120 ppm, menos de 100 ppm, menos de 90 ppm, menos de 80 ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm o menos de 3 ppm.

El término "ultrafiltración", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un procedimiento impulsado por presión en el que una mezcla, tal como una solución, p. ej., una que contiene una proteína de interés, se hace pasar a través de una membrana con el fin de concentrarla o purificarla. Las membranas de ultrafiltración tienen típicamente un tamaño de poro medio comprendido entre 1 y 50 nm, que se encuentra comprendido entre el tamaño de poro medio de las membranas de ósmosis inversa y las de microfiltración. El tamaño de los poros se suele cuantificar por su

capacidad para retener las proteínas de cierta masa molecular y normalmente se nombra en términos de un corte de masa molecular nominal (NMWCO, por su nombre en inglés) en kDa. Con la ultrafiltración se separan los solutos en función de la diferencia de velocidad de filtración de las diferentes sustancias a través de la membrana en respuesta a una determinada fuerza impulsora de presión, cuya velocidad depende del tamaño del soluto. Así pues, los solutos en la mezcla o la solución se separan en función de las diferencias de tamaño. La ultrafiltración se utiliza con frecuencia en el procedimiento posterior para la concentración de las proteínas, el cambio de tampones y la desalación, la purificación de proteínas, la eliminación de virus y el aclarado. El término "ultrafiltración" incluye la filtración de flujo tangencial (FFT) mediante la cual la mezcla, tal como la solución, se hace pasar horizontalmente a lo largo de la membrana de ultrafiltración. El término "ultrafiltración" no incluye la filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR) mediante la cual los solutos se separan no solo en función del tamaño, sino también del tamaño y de la carga.

El término "proteína total", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere esencialmente a todas las proteínas de una muestra, lo que incluye los fragmentos de proteínas de cualquier tamaño. Con frecuencia, en relación con el extracto celular del periplasma u otra recogida de cultivo celular, "proteína total" se refiere tanto a las PCH como a la proteína heteróloga expresada en el cultivo celular contenido en una muestra. La proteína total se puede determinar con el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

Se puede producir un fragmento de anticuerpo que puede purificarse de acuerdo con los métodos de la presente invención mediante el cultivo de las células hospedadoras transformadas con uno o más vectores de expresión que codifican el fragmento de anticuerpo recombinante. Las células hospedadoras son preferiblemente células procariotas, preferiblemente bacterias gramnegativas. Más preferiblemente, las células hospedadoras son células de *E. coli*. Las células hospedadoras procariotas para la expresión de las proteínas se conocen bien en la técnica (Terpe, 2006). Las células hospedadoras son células recombinantes que han sido modificadas genéticamente para producir la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo. Las células hospedadoras de *E. coli* recombinantes pueden proceder de cualquier cepa de *E. coli* idónea que incluye MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue y JM109. Un ejemplo es la cepa de *E. coli* es W3110 (ATCC 27 325), una cepa hospedadora utilizada con frecuencia para las fermentaciones de proteínas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden producir con el cultivo de las cepas de *E. coli* modificadas, por ejemplo, las cepas de *E. coli* que son mutantes metabólicos o deficientes en proteasas.

Un fragmento de anticuerpo que puede purificarse de acuerdo con los métodos de la presente invención se encuentra típicamente en el periplasma de la célula hospedadora de *E. coli* o en el sobrenadante del cultivo de las células hospedadoras, según la naturaleza de la proteína, la escala de producción y la cepa de *E. coli* utilizada. Los métodos para dirigir las proteínas a estos compartimentos se conocen bien en la técnica (Makrides, 1996). Los ejemplos de secuencias señal idóneas para dirigir las proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen las secuencias señal de PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*. Las proteínas pueden enviarse al sobrenadante gracias a las vías secretoras naturales o mediante la inducción de una fuga controlada de la membrana externa para provocar la secreción de la proteína, ejemplos de los cuales son el uso del líder de pelB, el líder de la proteína A, la coexpresión de la proteína liberadora de bacteriocina, la proteína liberadora de bacteriocina inducida mediante la mitomicina junto con la adición de glicina al medio de cultivo, y la coexpresión del gen *kil* para la permeabilización de la membrana. Lo más preferiblemente, en los métodos de la invención, la proteína recombinante se expresa en el periplasma de la *E. coli* hospedadora.

La expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras de *E. coli* también pueden estar bajo el control de un sistema inducible, por lo que la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* estará bajo el control de un promotor inducible. Muchos promotores inducibles idóneos para su uso en *E. coli* se conocen bien en la técnica y dependen del promotor; la expresión de la proteína recombinante puede inducirse mediante factores variables, tales como la temperatura o la concentración de una sustancia concreta en el medio de crecimiento. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores de *lac*, *tac* y *trc* de *E. coli*, que se inducen con lactosa o el análogo de la lactosa no hidrolizable, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los promotores de *phoA*, *trp* y *araBAD* que se inducen mediante fosfato, triptófano y L-arabinosa, respectivamente. La expresión puede inducirse, por ejemplo, mediante la adición de un inductor o un cambio de temperatura, cuando la inducción depende de la temperatura. Cuando la inducción de la expresión de la proteína recombinante se logra mediante la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede añadirse mediante cualquier método idóneo en función del sistema de fermentación y del inductor, por ejemplo, mediante adiciones puntuales o múltiples, o mediante una adición gradual del inductor a través de la comida. Se apreciará que puede haber un retraso entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión de la proteína, por ejemplo, cuando el inductor es la lactosa puede haber un retraso antes de que se produzca la inducción de la expresión de la proteína mientras que se acaba con cualquier otra fuente de carbono preexistente antes que la lactosa.

Los cultivos de células hospedadoras de *E. coli* (fermentaciones) pueden cultivarse en cualquier medio que garantice el crecimiento de *E. coli* y la expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente definido, tal como, p. ej., el descrito en (Durany O, 2004).

El cultivo de las células hospedadoras de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente idóneo, tal como un matraz para agitación o un fermentador, en función de la escala de producción requerida. Se encuentran disponibles varios fermentadores a gran escala con una capacidad de más de 1 000 litros hasta unos 100 000 litros. Preferiblemente, se utilizan fermentadores de 1 000 a 50 000 litros, más preferiblemente de 1 000 a 10 000 o 12 000 litros. También se pueden utilizar fermentadores a menor escala con una capacidad comprendida entre 0,5 y 1 000 litros.

- La fermentación de *E. coli* puede realizarse en cualquier sistema idóneo, por ejemplo, en modo continuo, por lotes o alimentado por lotes, en función de la proteína y del rendimiento necesario. El modo por lotes se puede usar con adiciones puntuales de nutrientes o inductores cuando sea necesario. Como alternativa, se puede usar un cultivo de alimentación por lotes y los cultivos se hacen crecer en modo de preinducción por lotes a la tasa máxima de crecimiento específico que se puede mantener con los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentación de nutrientes utilizados para controlar la tasa de crecimiento hasta que se complete la fermentación. El modo de alimentación por lotes también se puede utilizar antes de la inducción para controlar el metabolismo de las células hospedadoras de *E. coli* y para permitir que se alcancen densidades celulares más altas.
- Si se desea, las células hospedadoras se pueden someter a la recogida del medio de fermentación, p. ej., las células hospedadoras se pueden recoger de la muestra por centrifugación, filtración o mediante concentración. En concreto, los métodos de la invención son idóneos para la fabricación industrial a gran escala de anticuerpos de calidad terapéutica.
- En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende, antes de la etapa de captura por cromatografía de intercambio catiónico, una etapa de centrifugación del cultivo celular recogido, seguida de la suspensión de las células hospedadoras mediante la adición del tampón de extracción.
- Para los procedimientos de fermentación de *E. coli* en los que la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo, se encuentra en el espacio periplásmico de la célula hospedadora, se requiere la liberación de la proteína desde la célula hospedadora. La liberación se puede lograr mediante cualquier método idóneo, tal como la lisis celular por tratamiento mecánico o de presión, el tratamiento de congelación y descongelación, el choque osmótico, los agentes de extracción o el tratamiento térmico. Tales métodos de extracción para la liberación de proteínas se conocen bien en la técnica.
- En una realización preferida, se añade un tampón de extracción a la muestra y luego la muestra se somete a una etapa de tratamiento térmico. La etapa de tratamiento térmico es preferiblemente tal y como se describe en detalle en la patente de los EE. UU US 5 655 866. La etapa de tratamiento térmico hace posible obtener una muestra del fragmento de anticuerpo soluble, correctamente plegado y ensamblado, al facilitar la retirada de otro material relacionado con el anticuerpo.
- La etapa de tratamiento térmico se realiza al someter la muestra a una temperatura elevada deseada. Lo más preferiblemente, la etapa de tratamiento térmico se realiza dentro del margen de 30 °C a 70 °C. La temperatura se puede seleccionar según se desee y puede depender de la estabilidad del anticuerpo para la purificación. En otra realización, la temperatura está dentro del margen de 40 °C a 65 °C, o preferiblemente dentro del margen de 40 °C a 60 °C, más preferiblemente dentro del margen de 45 °C a 60 °C, incluso más preferiblemente dentro del margen de 50 °C a 60 °C, y lo más preferiblemente de 55 °C a 60 °C, de 58 °C a 60 °C, o a 59 °C. Así pues, las temperaturas mínimas son 30 °C, 35 °C o 40 °C y las temperaturas máximas 60 °C, 65 °C o 70 °C.
- La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente durante un período de tiempo prolongado. La duración del tratamiento térmico está preferiblemente entre 1 y 24 h, más preferiblemente entre 4 y 18 h, incluso más preferiblemente entre 6 y 16 h, y lo más preferiblemente entre 10 y 14 h o entre 10 y 12 h, por ejemplo, 12 h. Así pues, el tiempo mínimo para el tratamiento térmico es de 1, 2 o 3 h y el máximo es de 20, 22 o 24 h.
- En una realización particular, el tratamiento térmico se realiza entre 50 °C y 60 °C durante 10 a 16 h, y más preferiblemente a 59 °C durante 10 a 12 h. El experto en la técnica conocerá que las temperaturas y el tiempo pueden seleccionarse según se adapten a la muestra en cuestión y a las características del anticuerpo que se está produciendo.
- Después de la etapa de extracción, la mezcla que contiene la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo, puede someterse a una etapa de centrifugación y/o filtración antes de la etapa de ajuste del pH.
- En otras realizaciones, el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer o segundo aspecto de la invención se realiza con un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fab o un Fab', que se fija específicamente a VEGF-A, receptor de glucoproteína IIb/IIIa, C5, HER2/neu, TNF α , IL1 β , CD40-L, OX40 o ICOS.
- En una realización preferida de la invención, el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer o segundo aspecto de la invención se realiza con extracto celular del periplasma que comprende un fragmento de anticuerpo que es un fragmento de anticuerpo que tiene especificidad por el TNF α de humano, más preferiblemente CDP870, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 01/094585.
- En una realización, el fragmento de anticuerpo que tiene especificidad por el TNF α de humano comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 1 para la CDRH1, la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 2 para la CDRH2 o la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 3 para la CDRH3.
- En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende las CDR que tienen la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 4 para la CDRL1, la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 5 para la CDRL2 o la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 6 para la CDRL3.

- 5 En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende las CDR que tienen la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 1 para la CDRH1, la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 2 para la CDRH2 o la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 3 para la CDRH3, y las CDR que tienen la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 4 para la CDRL1, la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 5 para la CDRL2 o la secuencia que se muestra en la SEQ ID n.º 6 para la CDRL3.
- En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende la SEQ ID n.º 1 para la CDRH1, la SEQ ID n.º 2 para la CDRH2, la SEQ ID n.º 3 para la CDRH3, la SEQ ID n.º 4 para la CDRL1, la SEQ ID n.º 5 para la CDRL2 y la SEQ ID n.º 6 para la CDRL3.
- 10 El fragmento de anticuerpo es preferiblemente una molécula de fragmento de anticuerpo con CDR injertada y típicamente el dominio variable comprende las regiones flanqueantes aceptoras de humano y las CDR de donantes que no son de humano.
- Preferiblemente, el fragmento de anticuerpo comprende el dominio variable de la cadena ligera de CDP870 (SEQ ID n.º 7) y el dominio variable de la cadena pesada de CDP870 (SEQ ID n.º 8).
- 15 Se prefiere que el fragmento de anticuerpo sea un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo carboxilo de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o delatora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos restos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora o delatora. Tal fragmento Fab modificado tiene preferiblemente una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia dada como SEQ ID n.º 10 y la cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia dada como SEQ ID n.º 9.
- 20 En otras realizaciones, el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer o segundo aspecto de la invención se realiza con abciximab, ranibizumab, pexelizumab, CDP484 o CDP7657.

Equilibrado

- 25 En otras realizaciones de la invención, la columna de cromatografía de intercambio catiónico para la etapa de captura principal se equilibra con un tampón aniónico con la composición idónea para tamponar al pH y la conductividad requeridos (por ejemplo, acetato de sodio a 50 mM a pH 5 o lactato de sodio a 50 mM a pH 4,0). El equilibrado se puede lograr con al menos 2 volúmenes de columna del tampón de equilibrado, pero también puede incluir un procedimiento de equilibrado de dos pasos con dos volúmenes de columna de un tampón que contiene NaCl a 1 M (para garantizar que la columna esté cargada adecuadamente con el contraión correspondiente) seguido de al menos 2 volúmenes de columna del tampón de equilibrado.
- 30 En otras realizaciones de la invención, la columna de cromatografía de intercambio aniónico de la segunda etapa de cromatografía se equilibra de la misma manera, salvo que el tampón de equilibrado es idealmente un tampón catiónico, p. ej., Tris HCl a 20 mM a pH 8,0 o bis-Tris HCl a 20 mM a pH 7,0. El equilibrado de la columna de cromatografía de intercambio aniónico también se puede lograr con un procedimiento de equilibrado de dos pasos con el tampón que contiene NaCl a 1 M (para asegurar que la columna esté cargada adecuadamente con el contraanión relevante)
- 35 seguido del tampón de equilibrado; o un solo paso directamente con el tampón de equilibrado.

Lavado

- En otras realizaciones de la invención, después de cargar la columna de cromatografía de intercambio catiónico para la etapa principal, se lava con al menos 2 volúmenes de columna del tampón de equilibrado. Puede retirarse más impureza con el uso de un tampón de lavado con una conductividad más alta, p. ej., conductividad de 0,5 mS/cm o superior.
- 40 En otras realizaciones de la invención, después de cargar la columna de cromatografía de intercambio aniónico para la segunda etapa de cromatografía, la columna se lava con hasta 2 volúmenes de columna del tampón de equilibrado. También se pueden utilizar otros tampones con un pH y una conductividad similares. No se recomiendan los tampones con una conductividad más alta si se desea la máxima retirada de las impurezas relacionadas con el procedimiento.

Elución

- 45 En realizaciones adicionales de la invención, el fragmento de anticuerpo se eluye de la columna de cromatografía de intercambio catiónico en la etapa de captura principal con el uso de un tampón a un pH más alto, o con una conductividad más alta, o con una combinación de los dos. El incremento de conductividad se puede lograr con la adición de NaCl (u otra sal) al tampón de equilibrado a una concentración superior a 50 mM, preferiblemente superior a 100 mM e incluso más preferiblemente superior a 200 mM.
- 50 En realizaciones adicionales de la invención, la elución del fragmento de anticuerpo de la columna de cromatografía de intercambio aniónico en la segunda etapa de cromatografía se produce durante las etapas de carga y de lavado. Las impurezas fijadas relacionadas con el procedimiento se pueden eluir con el uso de un tampón a un pH más bajo, con una conductividad más alta, o con una combinación de ambos. Idealmente, la conductividad más alta debería ser de al menos de 70 mS/cm.

Tal y como se usa en la presente memoria, "un" o "una" pueden significar uno o más. El uso del término "o" en la presente memoria se usa para significar "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o que las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solo a las alternativas e "y/o". Tal y como se usa en la presente memoria, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, "entre X e Y" puede significar un margen que incluye X e Y.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 El Fab' de CDP870 se expresó como una proteína heteróloga en las células hospedadoras de *E. coli* W3110 a una concentración de 1,9 g/l. La proteína heteróloga se liberó del espacio periplásmico de las células hospedadoras mediante la adición de Tris-EDTA y el tratamiento térmico a 50 °C. El material celular se retiró por centrifugación y el extracto celular que contenía la proteína heteróloga se ajustó mediante la adición de ácido acético a un pH de 4,5. El extracto celular con el pH ajustado se aclaró luego con una combinación de centrifugación y filtración profunda con la filtración por 0,2 µm.

15 El extracto aclarado (corriente de alimentación) se diluyó con un factor de dilución de 4 con agua para lograr una conductividad de 3,5 mS/cm.

20 La corriente de alimentación que contenía el Fab' de CDP870 se cargó luego a aproximadamente 75 g/l de resina a una tasa de flujo de 400 cm/h en una columna de intercambio catiónico Capto S™ de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas (tamaño medio de las partículas de 90 µm) con un ligando de intercambio catiónico de tipo sulfonato unido mediante un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,11 a 0,14 mmol de Na⁺/ml)]. La columna de intercambio catiónico Capto S™ tenía una altura del lecho en la columna de 20 cm con un diámetro de 7,7 mm. La columna se había equilibrado antes de cargar la corriente de alimentación con 6 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético.

25 Después de la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético, hasta que todo el material sin fijar se eliminó con el lavado. La fracción con el Fab' de CDP870 se eluyó con un gradiente de 20 volúmenes de columna hasta una concentración de acetato de sodio a 50 mM y NaCl a 250 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético. El Fab' de CDP870 eluido se recogió cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 0,26 AU/cm hasta que cayó por debajo de 0,54 AU/cm.

30 La combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 se sometió a ultrafiltración en un concentrador por centrifugación con el uso de una membrana de ultrafiltración a base de sulfona de poliéter con un límite de masa molecular nominal de 10 kDa, lo que dio como resultado una concentración de 6 mg/ml de la combinación de fracciones con Fab' de CDP870. Posteriormente se realizó la diafiltración hasta que la combinación de fracciones con Fab' de CDP870 en Tris a 20 mM alcanzó el pH de 8,0 y una conductividad de 1,1 mS/cm. Se necesitaron 6 volúmenes del tampón para la diafiltración.

35 La combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Capto Q™ de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas (tamaño medio de las partículas de 90 µm) con un ligando de intercambio aniónico de tipo amina cuaternaria unido a través de un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,16 a 0,22 mmol de Cl⁻/ml)] a una velocidad de flujo de 500 cm/h y aplicando aproximadamente 5 g de Fab' de CDP870 por litro de resina. La columna de intercambio aniónico Capto Q™ tenía una altura del lecho de la columna de 10 cm con un diámetro de 7,7 mm. La columna se había equilibrado antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico con 3 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM / NaCl a 40 1 M ajustado a pH 8,0 con ácido clorhídrico y 5 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM ajustado a pH 8,0 con ácido clorhídrico.

A continuación, la columna se lavó con 5 volúmenes de la columna del tampón de equilibrado para recuperar el Fab' de CDP870.

45 La recogida de la fracción de Fab' de CDP870 comenzó cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 0,5 AU/cm poco después del inicio de la carga. El final de la recogida de fracciones se produjo durante el lavado, cuando la absorbancia de UV cayó por debajo de 0,5 AU/cm. El rendimiento del fragmento de anticuerpo en esta etapa fue del 90,5%.

Ejemplo 2

50 El Fab' de CDP870 se expresó como una proteína heteróloga en las células hospedadoras de *E. coli* a una concentración de 1,9 g/l. La proteína heteróloga se liberó del espacio periplásmico de las células hospedadoras mediante la adición de Tris-EDTA y el tratamiento térmico a 50 °C. El material celular se eliminó por centrifugación y el extracto celular que contenía la proteína heteróloga se ajustó a un pH de 4,5 mediante la adición de ácido acético. El extracto de células con el pH ajustado se aclaró luego con el uso de una combinación de centrifugación y filtración profunda con la filtración por 0,2 µm.

El extracto aclarado (corriente de alimentación) se diluyó con un factor de dilución de 4 con agua para lograr una conductividad de 3,5 mS/cm.

La corriente de alimentación que contenía el Fab' de CDP870 se cargó luego a aproximadamente 51 g/l de resina a una velocidad de flujo de 300 cm/h en una columna de intercambio catiónico Capto S de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas (tamaño medio de las partículas de 90 µm) con un ligando de intercambio catiónico de tipo sulfonato unido mediante un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,11 a 0,14 mmol de Na⁺/ml)]. La columna de intercambio catiónico Capto S tenía una altura del lecho de la columna de 20 cm con un diámetro de 16 mm. La columna se había equilibrado antes de cargar la corriente de alimentación con 3 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM / NaCl a 1 M ajustado a pH 4,5 con ácido acético y, posteriormente, 4 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético.

Después de la carga, la columna se lavó con 6 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético, hasta que todo el material sin fijar se eliminó con el lavado. La fracción de Fab' de CDP870 se eluyó con hasta 8 volúmenes de la columna del tampón con acetato de sodio a 50 mM y NaCl a 200 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético. El Fab' de CDP870 eluido se recogió cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 0,5 AU/cm hasta que cayó por debajo de 0,5 AU/cm.

La combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 se sometió a ultrafiltración en un concentrador por centrifugación (Amicon) con el uso de una membrana de ultrafiltración a base de sulfona de poliéter con un límite de masa molecular nominal de 10 kDa que dio como resultado una concentración de la combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 de 18 mg/ml. Posteriormente se realizó la diafiltración hasta que la combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 en Tris a 20 mM alcanzó el pH de 8,3 y una conductividad de 1,0 mS/cm. Se necesitaron 6 volúmenes de tampón para la diafiltración.

La combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Capto Q de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas (tamaño medio de las partículas de 90 µm) con un ligando de intercambio aniónico de tipo amina cuaternaria unido mediante un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,16 a 0,22 mmol de Cl⁻/ml)] a una velocidad de flujo de 250 cm/h y la aplicación de aproximadamente 30 g de Fab' de CDP870 por litro de resina. La columna de intercambio aniónico Capto QTM tenía una altura del lecho de la columna de 10 cm con un diámetro de 7,7 mm. La columna se había equilibrado antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico con 3 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM / NaCl a 1 M ajustado a pH 8,3 con ácido clorhídrico y 5 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM ajustado a pH 8,3 con ácido clorhídrico.

A continuación, la columna se lavó con 5 volúmenes de la columna del tampón de equilibrado para recuperar el Fab' de CDP870.

La recogida de las fracciones del Fab' de CDP870 comenzó cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 0,5 AU/cm poco después del inicio de la carga. El final de la recogida de las fracciones se produjo durante el lavado, cuando la absorbancia UV cayó por debajo de 2,0 AU/cm.

Ejemplo 3

El Fab' de CDP870 se expresó como una proteína heteróloga en las células hospedadoras de *E. coli* a una concentración de 2,5 g/l. La proteína heteróloga se liberó del espacio periplásmico de las células hospedadoras mediante la adición de Tris-EDTA y el tratamiento térmico a 50 °C. El material celular se retiró por centrifugación y el extracto celular que contenía la proteína heteróloga se ajustó a un pH de 4,5 mediante la adición de ácido acético. El extracto celular con el pH ajustado se aclaró luego con el uso de una combinación de centrifugación y filtración profunda con la filtración por 0,2 µm.

El extracto aclarado (corriente de alimentación) se diluyó con un factor de dilución de 4 con agua para lograr una conductividad de 4,0 mS/cm.

La corriente de alimentación que contenía el Fab' de CDP870 se cargó luego a aproximadamente 60 g/l de resina a una velocidad de flujo de 400 cm/h en una columna de intercambio catiónico Capto S de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas de 90 µm) con un ligando de intercambio catiónico de tipo sulfonato unido mediante un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,11 a 0,14 mmol de Na⁺/ml)]. La columna de intercambio catiónico Capto S tenía una altura del lecho de la columna de 24 cm con un diámetro de 20 cm. La columna se había equilibrado antes de cargar la corriente de alimentación con 3 volúmenes de la columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM / NaCl 1 M ajustado a pH 4,5 con ácido acético y, posteriormente, 4 volúmenes de la columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético.

Después de la carga, la columna se lavó con 6 volúmenes de columna del tampón de acetato de sodio a 50 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético, hasta que todo el material sin fijar se eliminó con el lavado. La fracción de Fab' de CDP870 se eluyó con hasta 5 volúmenes de la columna del tampón con acetato de sodio a 50 mM y NaCl a 250 mM ajustado a pH 4,5 con ácido acético. El Fab' de CDP870 eluido se recogió cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 1,75 AU/cm hasta que cayó por debajo de 0,55 AU/cm.

El Fab' de CDP870 se sometió a ultrafiltración en el modo de flujo tangencial con el uso de 0,4 m² de membrana de polietersulfona con un límite de masa molecular nominal de 10 kDa (Pall 10k Omega Centramate T-Series). El Fab' de CDP870 se concentró a 51 mg/ml antes de la diafiltración con 5,8 volúmenes de Tris a 20 mM, pH 8,5, hasta que el pH de la solución de Fab' fue pH 8,5 y la conductividad fue de 0,8 mS/cm. El Fab' se recuperó del equipo de ultrafiltración y se combinó con 600 ml del tampón de Tris a 20 mM, pH 8,5, que se usó para lavar cualquier Fab' que quedara en el sistema.

La combinación de las fracciones con Fab' de CDP870 se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Capto Q de GE Healthcare [perlas de agarosa rígidas altamente reticuladas (tamaño medio de las partículas de 90 µm) con un ligando de intercambio aniónico de tipo amina cuaternaria unido mediante un conector de dextrano (capacidad iónica de 0,16 a 0,22 mmol de Cl⁻/ml)] a una velocidad de flujo de 200 cm/h y la aplicación de aproximadamente 37 g de Fab' de CDP870 por litro de resina. La columna de intercambio aniónico Capto QTM tenía una altura del lecho de la columna de 24 cm con un diámetro de 20 cm. La columna se había equilibrado antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico con 3 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM / NaCl a 1 M ajustado a pH 8,5 con ácido clorhídrico y 5 volúmenes de la columna del tampón de Tris a 20 mM ajustado a pH 8,5 con ácido clorhídrico.

A continuación, la columna se lavó con 5 volúmenes de la columna del tampón de equilibrado para recuperar el Fab' de CDP870.

La recogida de la fracción de Fab' de CDP870 comenzó cuando la absorbancia UV a 280 nm superó las 0,5 AU/cm poco después del inicio de la carga. El final de la recogida de las fracciones se produjo durante el lavado, cuando la absorbancia UV cayó por debajo de 2,0 AU/cm.

Lista de referencias

Battersby, J.E., Snedecor, B., Chen, C., Campeón, K.M., Riddle, L. y Vanderlaan, M. (2001). Affinity-reversed-phase liquid chromatography assay to quantitate recombinant antibodies and antibody fragments in fermentation broth. *J Chromatogr A* 927, 61-76.

Do, T., Ho, F., Heidecker, B., Witte, K., Chang, L. y Lerner, L. (2008). A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expr. Purif.* 60, 147-150.

Durany O, C.G.d.M.C.L.-S.J. (2004). Studies on the expression of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Process Biochem* 39, 1677-1684.

Archivo de datos de GE Healthcare 11-0025-76 AE. Ion exchange chromatography. [11-0025-76 AE]. 2007. Tipo de referencia: Fichero de datos

Glover, D.J. y Humphreys, D.P. (2004). Antibody fragments. En *Antibodies*, volumen 1: Production and purification, G. Subramanian, ed. (Nueva York: Kluwer Academic / Plenum Publishers), págs. 25-73.

Holliger, P. y Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.

Humphreys, D.P. (2003). Production of antibodies and antibody fragments in *Escherichia coli* and a comparison of their functions, uses and modification. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 188-196.

Humphreys, D.P. y Glover, D.J. (2001). Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4, 172-185.

Humphreys, D.P., Heywood, S.P., King, L.M., Bowering, L.C., Turner, J.P. y Lane, S.E. (2004). Engineering of *Escherichia coli* to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein. *Protein Expr. Purif.* 37, 109-118.

Jana, S. y Deb, J.K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 289-298.

Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512-538.

McCue, J.T., Kemp, G., Low, D. y Quiñones-García, I. (2003). Evaluation of protein-A chromatography media. *J Chromatogr A* 989, 139-153.

Spitali, M. (2009). Downstream Processing of Monoclonal Antibody Fragments. En *Process scale purification of antibodies* U. Gottschalk, ed. John Wiley & Sons, Inc.), págs. 349-372.

Swartz, J.R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 12, 195-201.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72, 211-222.

Tugcu, N. (2008). Purification of proteins using displacement chromatography. Methods Mol Biol 421, 71-89.

Walsh, G. (2007). Biopharmaceuticals: Approval Trends in 2006. BioPharm International 21.

5 **Lista de secuencias**

<110> UCB Pharma, S.A.

<120> Purificación de proteínas

<130> G0136 WO

<150> GB1012603.5

10 <151> 2010-07-27

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H1 de CDP870

<400> 1

20 Asp Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H2 de CDP870

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> CDR-H3 de CDP870

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

40 <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR-L1 de CDP870

<400> 4
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR-L2 de CDP870
 <400> 5
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 10 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> CDR-L3 de CDP870
 <400> 6
 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 20 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena ligera variable de CDP870
 25 <400> 7
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 834 967 T3

<223> cadena pesada variable de CDP870

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera de CDP870

<400> 9

ES 2 834 967 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

5 <211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de CDP870

10 <400> 10

ES 2 834 967 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de un fragmento de anticuerpo a partir de un extracto celular del periplasma procedente de bacterias gramnegativas seleccionadas de las cepas de *E. coli* MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue, JM109 y W3110, que comprende:
- 5 a) una primera etapa de cromatografía para capturar el fragmento de anticuerpo, en la que una mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo a una concentración de al menos 1,5 g/l se somete a una cromatografía de intercambio catiónico y posteriormente se eluye para producir un primer eluido que contiene el fragmento de anticuerpo; y
- b) una segunda etapa de cromatografía, en la que el primer eluido se somete a una cromatografía de intercambio aniónico para capturar las impurezas y producir un flujo continuo que contiene el fragmento de anticuerpo,
- 10 en donde el procedimiento no comprende más de dos etapas de cromatografía.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que todas las etapas de cromatografía se realizan en una columna de cromatografía.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en modo de elución.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la primera etapa de cromatografía catiónica comprende las siguientes etapas en orden secuencial:
 - a) cargar una mezcla, tal como un extracto celular del periplasma, que contiene un fragmento de anticuerpo en la columna de intercambio catiónico,
 - b) lavar la columna de intercambio catiónico con un tampón de lavado, en la que la conductividad, el pH y la
 - 20 concentración de sales del tampón permanecen esencialmente sin cambios durante el lavado, y
 - c) eluir el fragmento de anticuerpo con un tampón de elución.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el pH del tampón de lavado es idéntico al pH de la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo antes de la primera etapa de cromatografía.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo, antes de la primera etapa de cromatografía, tiene un pH comprendido entre 4,0 a 5,0.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en la primera etapa de cromatografía la mezcla que contiene un fragmento de anticuerpo contiene una proteína de la célula hospedadora bacteriana en una cantidad que va de aproximadamente 200 μ g/ml a 10 000 μ g/ml, antes de ser sometida a cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cromatografía de intercambio catiónico en la primera etapa de cromatografía se realiza a una velocidad de flujo de al menos 300 cm/h.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de intercambio catiónico en la primera etapa de cromatografía se realiza a una conductividad de no más de 6 mS/cm.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de intercambio catiónico en la primera etapa de cromatografía se realiza en una columna de cromatografía que comprende sulfonilo, sulfopropilo o carboximetilo acoplado a una resina.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la columna de cromatografía de intercambio catiónico en la primera etapa de cromatografía tiene una capacidad de fijación dinámica para el fragmento de anticuerpo comprendida entre 50 y 75 g/l de resina.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la resina de la columna de cromatografía de intercambio catiónico en la primera etapa de cromatografía tiene un tamaño medio de las partículas de al menos 50 μ m.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la cromatografía de intercambio catiónico de la etapa de captura principal se cargan entre 5 y 100 g de fragmento de anticuerpo por litro de resina.
- 45 14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de intercambio aniónico en la segunda etapa de cromatografía se realiza en una resina que comprende amonio cuaternario (Q), dietilaminoetilo (DEAE) o trimetilaminoetilo (TMAE).
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento de anticuerpo es un Fab, un Fab' o un scFv.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el Fab o el Fab' se fija específicamente a VEGF-A, FcRn, OX40, receptor de la glucoproteína IIb/IIIa, C5, HER2/neu, TNF α , IL1 β o CD40-L.

17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el Fab o el Fab' es abciximab, ranibizumab, pexelizumab, CDP870, CDP484 o CDP7657.

- 5 **18.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento de anticuerpo recuperado del procedimiento contiene una proteína de la célula hospedadora en una cantidad de no más de 150 partes por millón.

Figura 1
Cromatograma de la etapa de captura en Capto S™

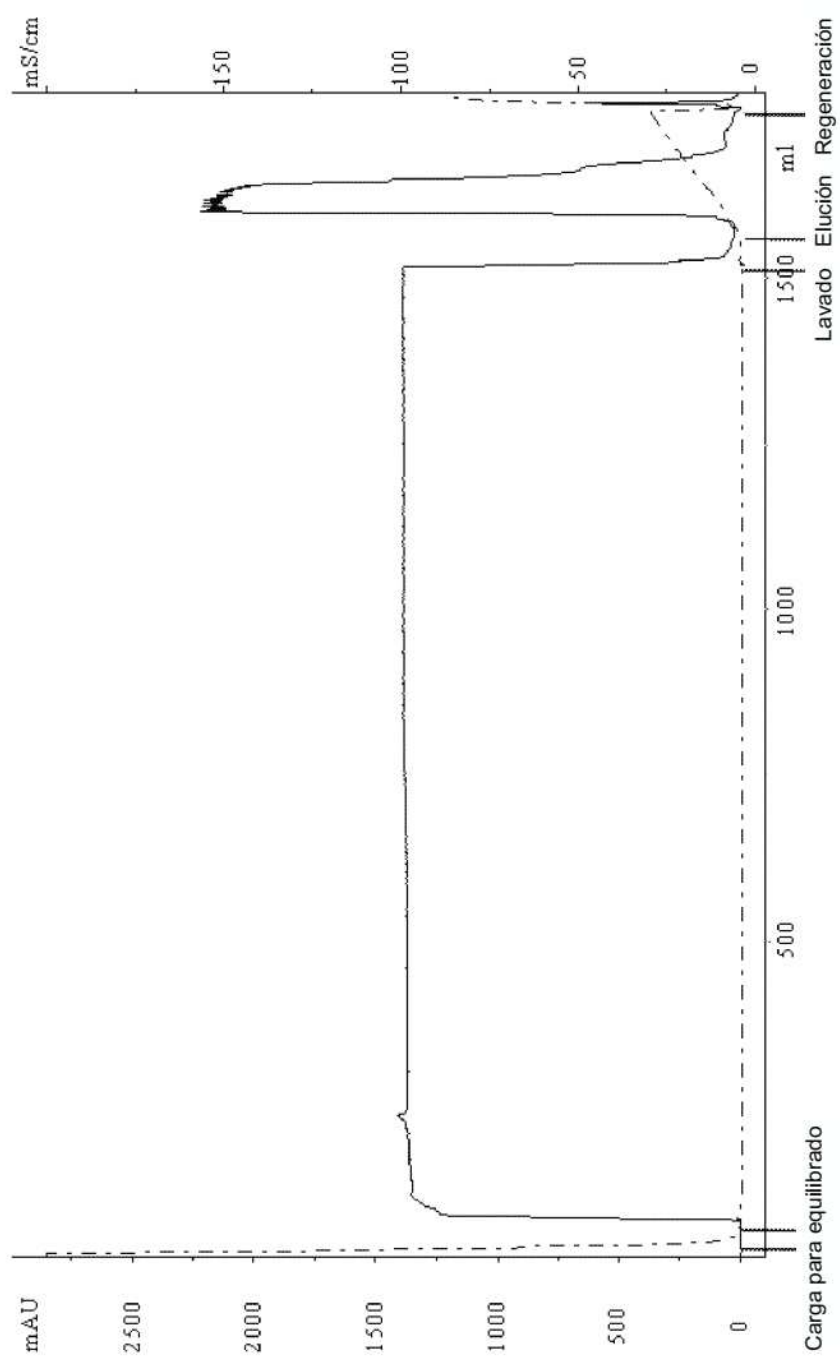


Figura 2

Cromatograma de la segunda etapa de la cromatografía en Capto Q™

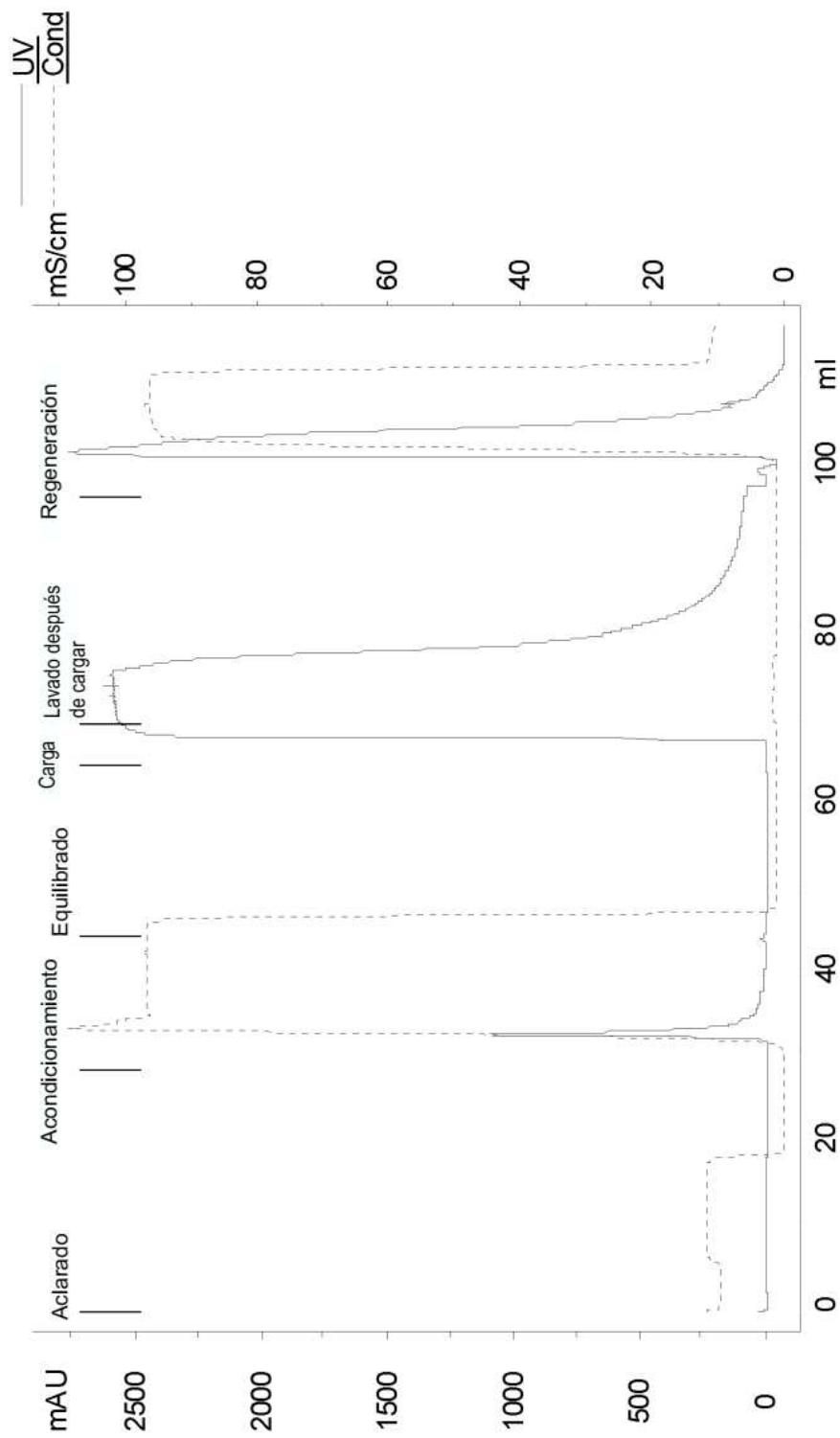
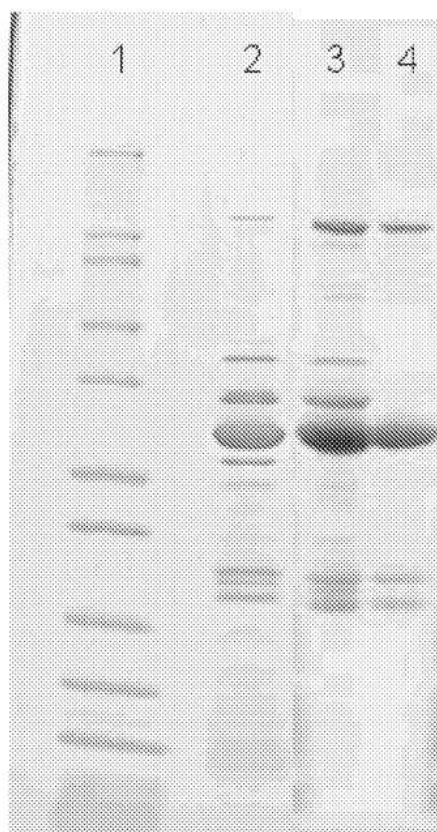


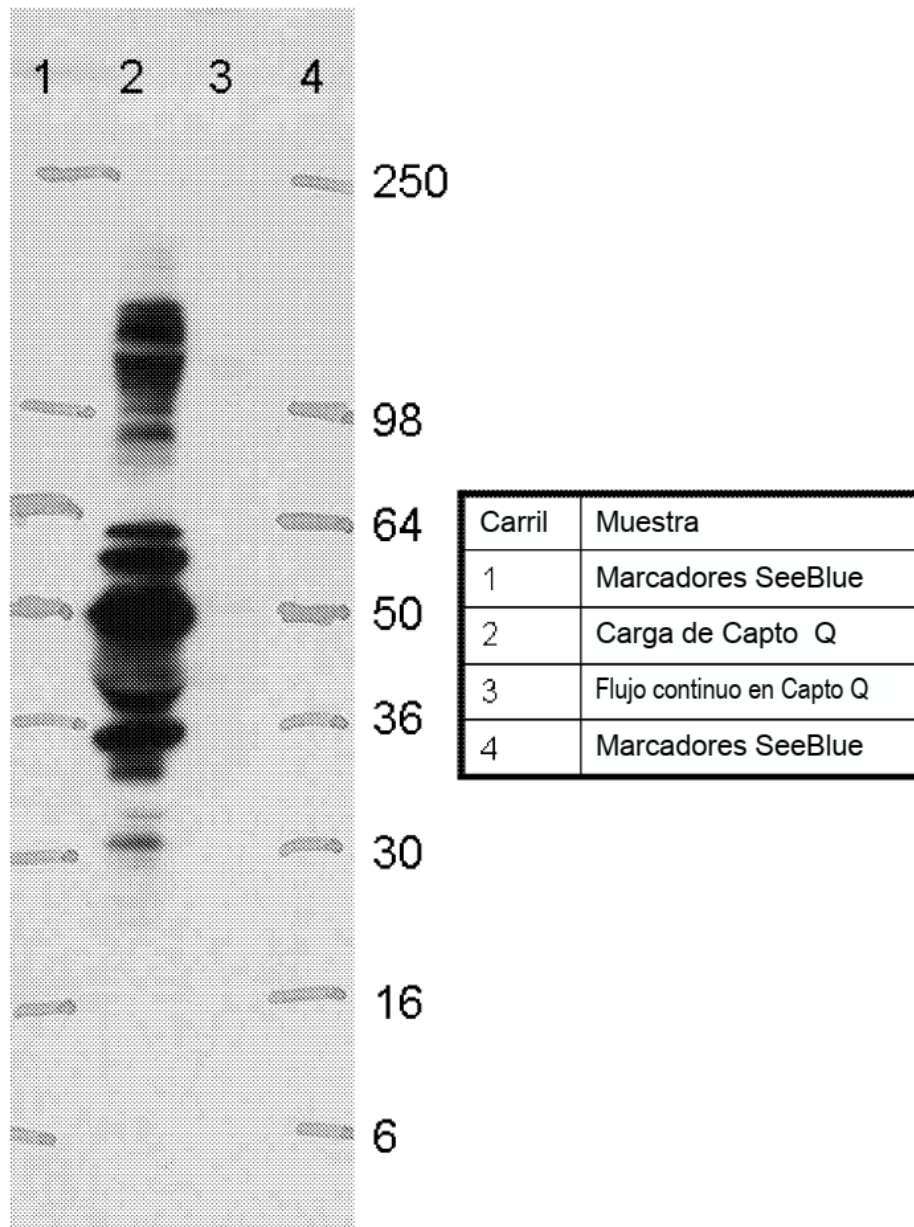
Figura 3

Análisis por SDS-PAGE de la carga de captura, el eluido de captura y el intercambio aniónico del flujo continuo



Carril	Muestra
1	Marcadores SeeBlue
2	Carga de Capto S
3	Carga de Capto Q
4	Flujo continuo en Capto Q

Figura 4
Inmunotransferencia de tipo Western de las PCH antes y
después de la columna de intercambio aniónico



Inmunotransferencia
de las PCH

Figura 5

En la SEQ ID n.º 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de CDP870.

Asp Tyr Gly Met Asn

En la SEQ ID n.º 2 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de CDP870.

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

En la SEQ ID n.º 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de CDP870.

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

En la SEQ ID n.º 4 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL1 de CDP870.

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

En la SEQ ID n.º 5 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL2 de CDP870.

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

En la SEQ ID n.º 6 se muestra la secuencia de aminoácidos de la CDRL3 de CDP870.

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

En la SEQ ID n.º 7 se muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de CDP870.

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Fig. 5 (cont.)

En la SEQ ID n.º 8 se muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de CDP870.

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn Trp
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr
Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu
Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

En la SEQ ID n.º 9 se muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del Fab de CDP870 con injerto anti-TNF α .

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

En la SEQ ID n.º 10 se muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del Fab de CDP870 con injerto anti-TNF α .

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe
Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala