

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 346 673**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

B01D 15/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2005 PCT/GB2005/004397**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2006 WO06054063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005 E 05803527 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **25.10.2017 EP 1814912**

54 Título: **Proceso para obtener anticuerpos**

30 Prioridad:

19.11.2004 GB 0425534

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

15.02.2018

73 Titular/es:

**UCB PHARMA, S.A. (100.0%)
ALLEE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUXELLES, BE**

72 Inventor/es:

**SEHDEV, MUKESH y
SPITALI, MARIANGELA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 346 673 T5

DESCRIPCIÓN

Proceso para obtener anticuerpos

5 La presente invención se refiere a métodos para aumentar los rendimientos en la producción y aislamiento de anticuerpos funcionales recombinantes, y en particular de anticuerpos terapéuticos. Los métodos se particularmente adecuados para la fabricación industrial a gran escala de anticuerpos terapéuticos.

10 Se han desarrollado rápidamente técnicas de ADN recombinante y son particularmente útiles en la producción de anticuerpo, en particular de anticuerpos terapéuticos. Los sistemas para la expresión de genes recombinantes son bien conocidos por los expertos en este campo en cuestión. Estos incluyen la expresión en células de mamífero, células de insecto, células micóticas, células bacterianas y animales y plantas transgénicos. La elección del sistema de expresión depende de las características de la proteína codificada, por ejemplo las modificaciones tras la traducción. Otras consideraciones incluyen el tiempo y, en particular, el coste implicado en la producción de la cantidad deseada de material de la calidad requerida. Estas últimas consideraciones son particularmente importantes en la producción de anticuerpos terapéuticos de la calidad requerida para la aprobación reglamentaria y en las cantidades necesarias para el tratamiento de un gran número de pacientes.

15 El sistema más ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes se basa en la expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*). Un problema específico encontrado con la utilización de *E. coli* es la dificultad de producir material de la calidad requerida en cantidades necesarias para la terapia. En particular, el tiempo y los costes implicados pueden ser prohibitivos. Un problema específico a destacar es la pérdida incurrida en el rendimiento de anticuerpos durante la extracción de los anticuerpos de *E. coli*. Un método que estudia parcialmente este último problema y que permite la producción de anticuerpo aceptable para uso terapéutico se describe en el documento US 5.665.866. Este método implica la utilización del tratamiento térmico para facilitar el aislamiento posterior de fragmentos Fab funcionales de anticuerpos a partir de anticuerpos no funcionales, realizándose el tratamiento térmico en cualquier momento durante la fermentación o el cultivo, o en cualquier etapa durante la extracción y purificación de los anticuerpos. A elevadas temperaturas superiores a la temperatura ambiente, los anticuerpos funcionales son extraordinariamente estables, mientras que muchas otras proteínas incluyendo las proteínas de la célula hospedadora y especies exentas de cadenas ligera y pesada y fragmentos no funcionales de anticuerpo, forman precipitados y/o aglomerados que se separan fácilmente del anticuerpo funcional durante los procedimientos de purificación primaria tales como filtración o centrifugación o cromatografía en lecho fluidizado. Aunque, proporcionalmente, los costes de purificación son una fracción del coste total de un producto de anticuerpo terapéutico, la proporción del coste de purificación aumentará más a medida que los costes de producción aguas arriba sean más económicos. Así, las mejoras en la recuperación y purificación de anticuerpos conducirán a costes de producción más hacia abajo con independencia de los medios de producción (Humphreys & Glover, *Curr. Opin. Drug Discovery & Development*, 2001,4:172-185). Por consiguiente, hay necesidad de métodos que introduzcan ahorros de tiempo y/o de costes en la producción de anticuerpos terapéuticos y, en particular, en la purificación, por ejemplo aumentando la recuperación de productos y/o mejorando la calidad de la corriente del producto.

20 Bajo rendimiento en el producto por fermentación o cultivo es con frecuencia un problema específico observado en la etapa de extracción primaria; la expresión de anticuerpos es alta dentro de las células pero un alto porcentaje de recuperación en la etapa de extracción primaria es extraordinariamente difícil de conseguir. El documento US 5.665.866 describe el aumento de rendimientos de la purificación inicial por inclusión de una etapa de tratamiento térmico que ayuda al proceso de purificación eliminando el anticuerpo no funcional.

25 El documento WO 2005019466 (publicado después de la fecha de prioridad de esta solicitud) describe un aumento en el rendimiento de proteínas recombinantes por la inclusión de una etapa de interrupción después de la fermentación pero antes del tratamiento aguas abajo.

30 El documento US 5.380.826 se refiere a la destrucción de células microbianas y a la extracción de componentes extracelulares sometiendo las células a tratamiento con un disolvente a una presión crítica y manteniendo una temperatura crítica en el intervalo 0 a 100°C, seguida de un repentino alivio de la presión produciendo de este modo una caída de presión, que permite la recogida de algunas proteínas o ácidos nucleicos liberados.

35 Esta invención descrita en la presente memoria se basa en la sorprendente e inesperada observación de que el tratamiento no lisante en combinación con el tratamiento térmico, produce un aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional en la etapa de extracción primaria de hasta 50%; es decir, el rendimiento del anticuerpo funcional aumenta por encima del tratamiento térmico solo. Esto permite ahorros enormemente beneficiosos en tiempo y costes de producción de cantidades de anticuerpos funcionales de calidad terapéutica.

40 Por consiguiente, se proporciona un método para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende cultivar una muestra de célula hospedadora *E. coli* transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante que se expresa en el periplasma de la célula hospedadora y someter dicha muestra de célula hospedadora a una etapa de tratamiento térmico, caracterizada porque dicha muestra se somete a una etapa de tratamiento no lisante a presión entre 1000 psi (68,9 bar) y 4000 psi (275,6 bar) antes de someterse a un aumento de temperatura dentro del intervalo de 30°C a 70°C durante un periodo de hasta 24 horas.

En un ejemplo preferido, la molécula de anticuerpo recombinante es parte al menos de una cadena ligera de anticuerpos y es parte al menos de una cadena pesada de anticuerpos de modo que al menos alguna de las moléculas de anticuerpo de la cadena ligera y pesada expresadas son capaces de combinarse para formar un anticuerpo funcional.

- 5 La descripción también proporciona un método para aumentar el rendimiento de moléculas de anticuerpos funcionales aisladas de una muestra que comprende moléculas de anticuerpos funcionales y moléculas de anticuerpos no funcionales, cuyo método comprende someter la muestra a un aumento de temperatura dentro del intervalo de 30°C a 70°C durante un periodo de hasta 24 horas, en el que la muestra se somete a una etapa de tratamiento no lisante antes de someterse al aumento de temperatura. Utilizando los métodos de la invención se consigue, por consiguiente, un aumento de rendimiento de los anticuerpos funcionales aislados u obtenidos.

En particular, el método permite un aumento en los rendimientos en el anticuerpo funcional aislado en un intervalo de temperaturas y condiciones de tratamiento, que pueden variarse según se requiera, y son comprendidos por un experto en la materia, al tener en cuenta las características particulares del anticuerpo funcional producido y el sistema de expresión que se utiliza.

- 15 Tal como se utiliza en la presente memoria, 'anticuerpo funcional' comprende las moléculas de anticuerpo que conservan la capacidad de reconocer o unirse específicamente al antígeno contra el que fueron producidos (antígeno afín). La producción de un anticuerpo funcional se demuestra por la presencia de una sola banda en SDS-PAGE no reductora correspondiente al peso molecular esperado del anticuerpo, o por ensayo de enlace directo utilizando BIAcore u otros métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo pero sin limitarse a, ELISA.
- 20 Los anticuerpos no funcionales comprenden fragmentos que no reconocen su antígeno afín, e incluyen anticuerpos incorrectamente plegados o incorrectamente ensamblados, cadenas pesadas y ligeras libres, y fragmentos de los mismos, incluyendo fragmentos parcialmente degradados de anticuerpos que no reconocen ni se unen a su antígeno afín.

- En los métodos de la invención una muestra puede ser el producto de una fermentación (o cultivo) que comprende *E. coli* que expresa un anticuerpo recombinante, en el que dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos funcionales y no funcionales. Si se desea, las células hospedadoras pueden someterse a recolección en el medio de fermentación, p. ej. pueden recogerse células hospedadoras de la muestra por centrifugación, filtración o por concentración. En particular, los métodos de la invención son adecuados para la preparación a gran escala industrial de anticuerpos de calidad terapéutica.

- 30 Una ventaja más de utilizar tratamiento no lisante en los métodos de la invención además del sorprendente aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional conseguido, es la facilidad de manipulación de la muestra a gran escala. La lisis produce un aumento de viscosidad que puede producir problemas en el tratamiento aguas abajo y purificación del anticuerpo funcional. En particular, la lisis de las células hospedadoras produce la liberación de proteínas de la célula hospedadora que hacen la purificación más costosa y que exige más tiempo a medida que pueden ser necesarias más etapas de purificación y/o se necesiten mayores cantidades de materiales de cromatografía para conseguir la pureza requerida. La liberación sustancial de ADN de la célula hospedadora aumenta la viscosidad de la muestra produciendo dificultades de filtración y centrifugación que es la causa principal de la pérdida de proteínas durante la clarificación. Una muestra lisada (es decir, que contiene proteínas y ADN de células hospedadoras) pueden también producir el bloqueo de materiales cromatográficos.

- 40 En la invención descrita en la presente memoria, el tratamiento no lisante comprende cualquier tratamiento que no produce lisis de una proporción sustancial de la *E. coli*. El tratamiento no lisante comprende el tratamiento a presión. Una "proporción sustancial" incluye una proporción del 80% o más de los organismos en una fermentación o cultivo presente en forma intacta, más preferiblemente más del 85%, aún más preferiblemente más del 90%, y aún más preferiblemente 95% o más que está intacta.

- 45 La lisis puede considerarse de cualquier manera conocida en la técnica, incluyendo: la visión al microscopio, análisis por selección de células activadas por fluorescencia (FACS) y análisis de proteínas totales frente a proteínas en el sobrenadante y/o en un sedimento organismos (células). En una realización, la lisis puede interpretarse después del tratamiento no lisante comparando la proteína total en una muestra antes y después del tratamiento. Si un tratamiento está produciendo lisis, la proteína total presente en el sobrenadante de la muestra tratada aumentaría en comparación con la proteína total presente en dicha muestra sin tratar, por ejemplo determinada utilizando un análisis de Bradford. En una realización preferida, se realiza el análisis FACS en el que la muestra se marca con un colorante fluorescente seguido de tratamiento no lisante y análisis FACS. Aún más preferentemente, el análisis FACS se realiza antes del tratamiento proporcionando un valor de referencia para comparación.

- 55 Así, el tratamiento no lisante puede incluir preacondicionamiento mediante resuspensión suave durante un periodo de tiempo, por ejemplo mediante agitación o mezclado, o mediante resuspensión manual como por ejemplo pipeteando, en, p. ej. un tampón. Por ejemplo, el preacondicionamiento se realiza durante entre 1 hora y 24 horas, preferiblemente entre 1 hora y 20 horas, más preferiblemente entre 2 horas y 18 horas, 4 horas y 16 horas, 6 horas y 16 horas y aún más preferentemente durante 12, 14 o 16 horas. Así, el tiempo mínimo para el preacondicionamiento es de 1, 2 o 4 horas y el máximo es de 16, 18 o 24 horas. El preacondicionamiento puede realizarse por rotación de

50 a 250 rpm, preferiblemente de 60 rpm a 100 rpm y aún más preferiblemente durante 14 o 16 horas. Durante el preacondicionamiento las células se mantienen a una temperatura dentro del intervalo de 4°C a 30°C, más preferiblemente entre 4°C y 20°C y aún más preferiblemente a temperatura ambiente.

5 El tratamiento no lisante comprende el someter las células hospedadoras a presiones aumentadas, por ejemplo utilizando una cafetera francesa. En un ejemplo específico, la muestra es el producto de una fermentación de *E. coli*, expresando dicha *E. coli* un anticuerpo recombinante, que se somete a tratamiento a presión en una cafetera francesa. En un realización, el tratamiento a presión se realiza a 68,9 bar (1000 psi), 86,1 bar (1250 psi), 103,3 bar (1500 psi), 120,6 bar (1750 psi), 137,8 bar (2000 psi), 155,0 (2250 psi), 172,2 bar (2500 psi), 189,5 bar (2750 psi), 206,6 bar (3000 psi), 223,9 bar (3250 psi), 241,2 bar (3500 psi) o 275,6 bar (4000 psi). Más preferiblemente, el
10 tratamiento a presión se realiza entre 68,9 bar (1000 psi) y 206,6 bar (3000 psi) y aún más preferiblemente a 137,8 bar (2000 psi). El tratamiento a presión que es sustancialmente no lisante (es decir que produce menos del 20% de lisis) puede determinarse por simple experimentación dependiendo del tampón, del tipo de células que comprende la muestra y de la presión.

15 Además se proporciona un método según la presente descripción para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende cultivar una muestra de célula hospedadora transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante y someter dicha muestra a tratamiento de preacondicionamiento con agitación. La descripción proporciona además un método para aumentar el rendimiento de moléculas de anticuerpos funcionales aisladas de una muestra, comprendiendo dicha muestra moléculas solubles, de anticuerpos funcionales, y moléculas de anticuerpos no funcionales, cuyo método comprende someter
20 la muestra a un aumento de temperatura dentro del intervalo de 30°C a 70°C durante un periodo de hasta 24 horas, caracterizado dicho método porque la muestra se somete a una etapa de tratamiento no lisante que comprende preacondicionar la muestra antes de someter la muestra a un aumento de temperatura. Preferiblemente, el tratamiento no lisante comprende preacondicionamiento por agitación durante 14 o 16 horas.

25 Preferiblemente, las células hospedadoras se recogen de una fermentación o cultivo, p. ej. por centrifugación, y se ponen en suspensión en una solución tamponada utilizando sales tamponadas tal como, pero no limitadas a, Tris, acetato o fosfato. El pH de la solución puede estar, por ejemplo, entre pH 2 y pH 10 y estará aún más preferiblemente entre pH 6 y pH 8. En una realización, el pH es 6,8 o dentro del intervalo de 0,1 unidad de pH 6,8. Un tampón aún más preferido es el tampón Tris, pH 7,4 que puede opcionalmente comprender además EDTA, por ejemplo pero sin limitación, Tris, 100 mM, pH 7,4 que contiene EDTA 10 mM. Las células hospedadoras se ponen en suspensión preferiblemente en el último tampón antes de someterse a una etapa de tratamiento no lisante. El
30 tratamiento no lisante puede realizarse en el caldo de cultivo o medio de cultivo como para la fermentación dependiendo del anticuerpo que se está purificando, por ejemplo preacondicionamiento en caldo de cultivo. Por lo tanto, en un ejemplo, el aumento de rendimiento por preacondicionamiento en caldo de cultivo varía dependiendo del anticuerpo que es expresado por la célula hospedadora. El experto puede determinar experimentalmente si el preacondicionamiento en el caldo de cultivo es adecuado para cualquier anticuerpo específico. Aún más preferiblemente, el tratamiento no lisante se realiza en un tampón como se describió anteriormente.

35 En una realización aún más preferida, los métodos de la invención se realizan utilizando una muestra de fermentación de *E. coli* que expresa un anticuerpo recombinante. La muestra comprende tampón Tris/EDTA entre pH 6 y pH 8, preferiblemente pH 7,4, más preferiblemente a pH 6,8, y se somete a tratamiento a presión en una cafetera francesa a 137,8 bar (2000 psi).
40

Las etapas de tratamiento térmico se realizan dentro del intervalo de 30°C a 70°C. La temperatura puede seleccionarse como se desee y puede depender de la estabilidad del anticuerpo para purificación. En otra realización, la temperatura está dentro del intervalo 40°C a 65°C, o preferiblemente dentro del intervalo 40°C a 60°C, más preferiblemente dentro del intervalo 45°C a 60°C, aún más preferiblemente dentro del intervalo 50°C a 60°C y
45 aún más preferiblemente de 55°C a 60°C. Así, las temperaturas mínimas son 30°C, 35°C o 40°C y las temperaturas máximas 60°C, 65°C o 70°C. La duración del tratamiento térmico es preferiblemente de entre 1 y 24 horas, más preferiblemente de entre 4 y 18 horas, aún más preferiblemente de entre 6 y 16 horas y aún más preferiblemente entre 10 y 14 horas, por ejemplo 12 horas. Así, el tiempo mínimo para el tratamiento térmico es de 1, 2 o 3 horas y el máximo es de 20, 22 o 24 horas.

50 En una realización específica, el tratamiento térmico se realiza de 50°C a 60°C durante 12 a 16 horas, y más preferiblemente a 50°C durante 14 horas. Un experto en la materia entenderá que las temperaturas y el tiempo pueden seleccionarse como conviene a la muestra en cuestión y a las características del anticuerpo que se produce.

La preparación del anticuerpo puede comprender además procedimientos de purificación primaria tales como filtración y/o centrifugación. Además se incluye cromatografía en lecho fluidizado. Los procedimientos de purificación
55 aguas abajo preferidos incluyen cromatografía de intercambio iónico, microfiltración, ultrafiltración, diafiltración y captura en lecho fijo, captura en lecho expandido y combinaciones de cualquiera de éstas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, 'anticuerpos' incluyen fragmentos funcionalmente activos, derivados o análogos y puede ser, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, bi-, tri- o tetravalentes, anticuerpos humanizados o híbridos, anticuerpos monocatenarios, tales como los fragmentos Fv monocatenarios,

- fragmentos Fab, fragmentos Fab' y Fab₂, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. Estos anticuerpos y sus fragmentos pueden ser naturales, humanizados, híbridos o anticuerpos injertados a CDR y pueden utilizarse técnicas convencionales de biología molecular para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de una especie no humana que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (RDC) procedentes de una especie no humana, y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089). Las moléculas de anticuerpo purificadas que utilizan los métodos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.
- 5 Los métodos para crear estas moléculas de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341:544; Orlandi *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 322:323; Bird *et al.*, 1988, *Science*, 242:423; Queen *et al.*, documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10:1-142; Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216:165-181).
- 10 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocito B humano (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today*, 4:72), y la técnica de hibridoma-EBV (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).
- Los anticuerpos híbridos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que se han modificado genéticamente de forma que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Es probable que estos anticuerpos híbridos sean menos antigénicos. Pueden prepararse anticuerpos bivalentes por los métodos conocidos en la técnica (Milstein *et al.*, 1983, *Nature*, 305:537-539; documento WO 93/08829; Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659). Los anticuerpos Bi-, tri- y tetra-valentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, el documento WO 92/22853).
- 20 Pueden generarse también secuencias de anticuerpos utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales basados en la clonación molecular y en la expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulinas generada a partir de linfocitos individuales que se seleccionaron para la producción de anticuerpos específicos, tales como los descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(15):7843-7848, y en el documento WO 92/02551. Estos últimos métodos se basan en el aislamiento de células productoras de anticuerpos individuales que a continuación se expanden de manera clonal seguido de la detección sistemática de estos clones que están produciendo un anticuerpo que reconoce su antígeno afín, y, si se desea, la posterior identificación de la secuencia de sus genes variables en la cadena pesada (V_H) y ligera (V_L). Alternativamente, las células productoras de anticuerpos que reconocen su antígeno afín pueden cultivarse conjuntamente seguido de la detección sistemática.
- 30 Los anticuerpos preparados utilizando los métodos de la invención son los anticuerpos más preferiblemente humanizados que pueden estar unidos a toxinas, fármacos, compuestos citotóxicos o polímeros u otros compuestos que prolongan la vida media del anticuerpo cuando se administran a un paciente.
- 35 Los métodos para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. En los métodos de la invención, se produce un anticuerpo recombinante en las bacterias, p. ej. en *E. coli* (véase Venna *et al.*, 1988, *J. Immunol. Methods* 216:165-i 81; Simmons *et al.*, 2002, *J. Immunol. Methods* 263:133-147).
- 40 Las células hospedadoras de *E. coli* pueden ser cepas naturales de *E. coli* o cepas mutadas capaces de producir proteínas recombinantes. Ejemplos de cepas de *E. coli* hospedadoras específicas incluyen MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1 Blue y JM109. Los ejemplos incluyen también cepas modificadas de *E. coli*, por ejemplo mutantes metabólicos y cepas carentes en proteasa. Un hospedador de *E. coli* preferido es *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) cepa hospedadora utilizada generalmente para fermentaciones de proteínas recombinantes. El anticuerpo recombinante producido utilizando los métodos de la presente invención se expresa en el periplasma de la célula hospedadora de *E. coli*. Los métodos para dirigir las proteínas a este compartimento son bien conocidos en la técnica, para un estudio véase Makrides, *Microbiological Reviews*, 1996, 60, 512-538. Ejemplos de secuencias señal adecuadas para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen las secuencias señal PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*.
- 50 La expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras *E. coli* puede estar también bajo el control de un sistema inducible, mediante el cual la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* está bajo el control de un activador inducible. En la técnica son muy conocidos muchos activadores inducibles adecuados para su utilización en *E. coli* y dependiendo del activador, la expresión de la proteína recombinante puede ser inducida por varios factores tal como la temperatura o la concentración de una sustancia específica en el medio de cultivo (Baneyx, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10:411-421; Goldstein y Doi, 1995, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 105-128). Ejemplos de activadores inducibles comprenden los activadores *lac*, *tac* y *trc* de *E. coli* que son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los activadores *phoA*, *trp* y *araBAD* que son inducidos por fosfato, triptófano y L-arabinosa respectivamente. La expresión puede inducirse,
- 55

- por ejemplo, por la adición de un inductor o por un cambio en la temperatura en la que la inducción depende de la temperatura. Cuando la inducción de la expresión de la proteína recombinante se consigue mediante la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede añadirse por cualquier método apropiado dependiendo del sistema de fermentación y del inductor, por ejemplo, por una o múltiples adiciones por inyección o mediante una adición gradual de inductor con un alimento. Se valorará que pueda haber un retraso entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión proteica, por ejemplo, cuando el inductor es la lactosa puede haber un retraso antes que ocurra la inducción de la expresión proteica mientras que se utilice cualquier fuente de carbono preexistente antes de la lactosa.
- Los cultivos (fermentaciones) de células hospedadoras de *E. coli* pueden cultivarse en cualquier medio que soporte el cultivo de *E. coli* y la expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente definido, tales como los proporcionados en Pirt S. J. (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation, Blackwell Scientific Publications, con modificaciones cuando proceda para controlar la velocidad de crecimiento como se describe en la presente memoria. Un ejemplo de ejemplo un medio adecuado es 'SM6E' como se describe en Humphreys *et al.*, 2002, Protein Expression and Purification, 26:309-320.
- El cultivo de las células hospedadoras de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado tal como un matraz con agitador o un fermentador dependiendo de la escala de producción requerida. Están disponibles varios fermentadores a gran escala con una capacidad de más de 1.000 litros hasta aproximadamente 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. Pueden utilizarse también fermentadores a escala más pequeña con una capacidad de entre 0,5 y 1.000 litros.
- La fermentación de *E. coli* puede realizarse en cualquier sistema adecuado, por ejemplo en modo continuo, por lotes o semicontinuo (Thiry & Cingolani, 2002, *Trends in Biotechnology*, 20:103-105) dependiendo de la proteína y los rendimientos requeridos. El modo por lotes puede utilizarse con adiciones por inyección de nutrientes o inductores cuando se requiera. Alternativamente, puede utilizarse un cultivo semicontinuo y las cultivos desarrollados en modo pre-inducción por lotes a la velocidad máxima de crecimiento específico que puede mantenerse utilizando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentos nutrientes utilizados para controlar la velocidad de crecimiento hasta que termina la fermentación. Puede utilizarse también pre-inducción en modo semicontinuo para controlar el metabolismo de las células hospedadoras de *E. coli* y para permitir que se alcancen mayores densidades celulares (Lee, 1996, *Tibtech*, 14:98-105).
- Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las demás realizaciones *mutatis mutandis*. Todas las publicaciones, incluyendo, pero sin estar limitadas a, las patentes y solicitudes de patente citadas en esta memoria se incorporan en la presente memoria por referencia como si cada publicación individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia en la presente memoria como si estuviera expuesta en su totalidad.
- La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deberían considerarse de ninguna manera que limitan el alcance de la presente invención.
- La **Figura 1** es un histograma que muestra el efecto del tratamiento (agitación) de precondicionamiento sobre el rendimiento del anticuerpo funcional A. La duración del precondicionamiento se muestra en horas. Las cifras encima de cada barra indican el rendimiento del anticuerpo funcional A en mg/litro de resuspensión clarificada.
- La **Figura 2** es un histograma que muestra el efecto del tratamiento a presión sobre el rendimiento del anticuerpo funcional A: La barra 1 es una referencia sin tratamiento a presión; las barras 2, 3, 4 y 5 representan tratamientos a 34,5 bar (500 psi), 68,9 bar (1000 psi), 137,8 bar (2000 psi) y 275,6 bar (4000 psi), respectivamente.
- Las **Figuras 3a) y b)** son histogramas que muestran el efecto del tratamiento a presión y del precondicionamiento sobre el rendimiento del anticuerpo funcional B a 60°C (Panel 3a) y 30°C (Panel 3b): En cada caso la barra 1 es una referencia sin tratamiento no lisante; las barras 2, 3 y 4 representan tratamientos a 68,9 bar (1000 psi), 137,8 bar (2000 psi), y 275,6 bar (4000 psi), respectivamente. Las barras 5 y 6 representan 24 horas de tratamiento de precondicionamiento en Tris/EDTA a temperatura ambiente (barra 5) o 4°C (barra 6). Las cifras encima de cada barra indican el rendimiento del anticuerpo funcional B en mg/litro de resuspensión clarificada. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.
- Las **Figuras 4a) y b)** son histogramas con panel a) que muestra el efecto del tratamiento a presión sobre el rendimiento del anticuerpo funcional C después de la extracción a 60°C expresada en gramos de Fab' por litro y panel b) que muestra la proteína total presente en el extracto clarificado después del tratamiento térmico. En el panel a), las cifras encima de cada barra indican el rendimiento del anticuerpo funcional A en g/litro de resuspensión clarificada.
- La **Figura 5** es un histograma que muestra el efecto del tratamiento a presión sobre la lisis celular utilizando el análisis FACS de *E. coli* en presencia de yoduro de propidio.

Ejemplo 1: Efecto del tratamiento no lisante (preacondicionamiento)

(a) El anticuerpo A (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo A insertado. La fermentación (en DD53) se realizó a 25°C hasta que la D.O.₆₀₀ fue 111,6 y estaba lista para la recolección. Se centrifugaron alícuotas de 50 ml del cultivo de la recolección a temperatura ambiente y los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 5ml de sobrenadante de cultivo más 29 ml de H₂O y 5 ml de Tris 1 M, pH 7,4 que contenía EDTA 100 mM. Los sedimentos celulares resuspendidos se sometieron a agitación de preacondicionamiento a 60 rpm durante los tiempos indicados en la Figura 1. Después del preacondicionamiento los sedimentos celulares resuspendidos se sometieron a tratamiento térmico a 50°C con agitación a 170 rpm durante 14 horas. Después del tratamiento térmico, los sedimentos celulares resuspendidos se clarificaron por centrifugación a 4200 rpm en una centrifugadora Beckman J.6 durante 30 min. a 4°C. En el sobrenadante que contenía funcional anticuerpo A se analizó el Fab' utilizando el análisis HPLC de la proteína G en tampón fosfato 20 mM. El anticuerpo A se eluyó utilizando un gradiente de pH desde pH 7,4 en inyección, reduciendo hasta pH 2,5. Los rendimientos en anticuerpo funcional se calcularon por comparación con una concentración patrón de Fab'.

Puede observarse un aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional en cualquier momento de la agitación de preacondicionamiento en comparación con falta de agitación de preacondicionamiento (Figura 1). Se consiguió un aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional A de alrededor del 30% en cualquier punto de tiempo mediante la utilización de este tratamiento no lisante.

(b) El anticuerpo B (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo B insertado como se describió anteriormente. Se centrifugaron alícuotas de 50 ml de cultivo recogido a temperatura ambiente y los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 5 ml de sobrenadante de cultivo más 29 ml de H₂O y 5 ml de Tris 1 M, pH 7,4 que contenía EDTA 100 mM antes de someterse a preacondicionamiento por agitación a 60 rpm a temperatura ambiente o 4°C durante 24 horas (véanse las Figuras 3a y b). El tratamiento térmico y la clarificación se realizaron como se describió anteriormente pero a las temperaturas indicadas en la leyenda de las Figuras 3a y 3b.

Puede observarse un aumento en el rendimiento en anticuerpo funcional a temperatura ambiente y a 4°C para estas resuspensiones en Tris/EDTA.

Ejemplo 2: Efecto de tratamiento no lisante (presión)

(a) El anticuerpo A se expresó en *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. Se prepararon sedimentos celulares resuspendidos en sobrenadante de cultivo, H₂O y Tris/EDTA, como en el Ejemplo 1, antes de ser sometidos a tratamiento a presión a varias presiones utilizando una cafetera francesa. Se realizó el tratamiento térmico y se calcularon los rendimientos en anticuerpo funcional como se describe en el Ejemplo 1.

Puede observarse un aumento en el rendimiento en anticuerpo funcional a todas las presiones excepto a 34,5 bar (500 psi) en comparación con falta de presión (Figure 2). Se consiguió un aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional A mediante la utilización de este tratamiento no lisante, particularmente a 68,9 bar (1000 psi) y 137,8 bar (2000 psi). A 275,6 bar (4000 psi) era evidente alguna lisis celular pero ésta no era sustancial (es decir, menos del 20%).

(b) El anticuerpo B (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo B insertado. Se realizó la fermentación y se prepararon sedimentos celulares resuspendidos en sobrenadante de cultivo, H₂O y Tris/EDTA, según se describe en el Ejemplo 1 antes de someterse a tratamiento a presión a varias presiones utilizando una cafetera francesa. El tratamiento térmico se realizó a (i) 30°C (Figura 3a) o (ii) 60°C (Figura 3b) con agitación a 170 rpm durante 14 horas. Después del tratamiento térmico, la resuspensión celular se clarificó por centrifugación y se calcularon los rendimientos en anticuerpo funcional según se describe en el Ejemplo 1.

Se consiguió un aumento en el rendimiento de anticuerpo funcional B mediante la utilización de este tratamiento no lisante, particularmente a t 68,9 bar (1000 psi) y 137,8 (2000 psi) pero no a 34,5 bar (500 psi) (Figuras 3a y 3b). A 275,6 bar (4000 psi) era evidente alguna lisis celular pero ésta no era sustancial.

(c) El anticuerpo C (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo C insertado. Se realizó la fermentación y se prepararon sedimentos celulares resuspendidos en sobrenadante de cultivo, H₂O y Tris/EDTA, según se describe en el Ejemplo 1 antes de someterse a tratamiento a presión a varias presiones utilizando una cafetera francesa. El tratamiento térmico se realizó a 60°C (Figura 4) con agitación a 170 rpm durante 14 horas. Después del tratamiento térmico, la resuspensión celular se clarificó por centrifugación y se calcularon los rendimientos en anticuerpo funcional según se describe en el Ejemplo 1.

Un aumento en el rendimiento de anticuerpo funcional puede observarse a presiones suaves de entre 68,9 bar (1000 psi) y 275,6 bar (4000 psi) en comparación con la falta de presión (Figura 4a) mientras que puede observarse un aumento muy pequeño en proteína total (Fab' más cualquiera de las proteínas de la célula hospedadora), medida por el análisis de Bradford, (Figura 4b). Este resultado se confirma por análisis SDS-PAGE del extracto clarificado

(no mostrado). Estos resultados indican que no se produjo lisis sustancial de células hospedadoras a presiones comprendidas entre 68,9 bar (1000 psi) y 275,6 bar (4000 psi). De este modo, se consiguió un aumento en el rendimiento del anticuerpo funcional C después de tratamiento térmico a 60°C mediante la utilización de este tratamiento no lisante.

- 5 (d) El anticuerpo D (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo D insertado. Se realizó la fermentación y se recogió por centrifugación. La suspensión celular resuspendida se preparó en tampón de extracción (Tris 100 mM/EDTA 10 mM, pH 7,4) hasta el volumen original y se sometió a tratamiento a presión a varias presiones mediante un homogeneizador MG (de un solo paso). El tratamiento térmico se realizó a 60°C con agitación a 170 rpm durante 14 horas. Después del tratamiento térmico, la resuspensión celular se clarificó por centrifugación y se calcularon los rendimientos en anticuerpo funcional según se describe en el Ejemplo 1.

10 Un aumento en el rendimiento de anticuerpo funcional puede observarse a presiones suaves comprendidas entre 68,9 bar (1000 psi) y 275,6 bar (4000 psi) en comparación con la falta de presión (Figura a) mientras que puede observarse (Tabla 1) un aumento muy pequeño en proteína total (Fab' más cualquiera de las proteínas de la célula hospedadora), medida por el análisis de Bradford.

15

Tabla 1 Aumento de rendimiento en anticuerpos con tratamiento no lisante

Presión	Concentración Fab' (g/l)	Proteína total (g/l)
0 Pa (0 psi)	0,685	1,46
13,79 Pa (2000 psi)	0,794	1,26
20,68 Pa (3000 psi)	0,878	1,46
27,58 Pa (4000 psi)	0,896	1,50

Ejemplo 3: Medición de la lisis celular utilizando análisis FACS

- 20 El anticuerpo A (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* utilizando el vector pTT0D con ADN que codifica el anticuerpo A insertado. La suspensión celular se volvió a poner en suspensión en tampón de extracción tris/EDTA hasta volumen original, según se describe en el Ejemplo 1, y se pasó a través de un homogeneizador MG (de un solo paso) a varias presiones (véase la Figura 5). Las corrientes alimenticias procedentes del homogeneizador se recogieron y se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2 en solución salina tamponada con fosfato. Se añadieron (2µl) de yoduro de propidio (200 µg/ml), un colorante fluorescente, a cada muestra (500 µl). El yoduro de propidio se une al ADN pero no puede atravesar una membrana citoplásmica intacta. Se evaluó cada reacción utilizando un Becton Dickinson FACSCalibur para determinar las células lisadas y sin lisar. El cultivo recogido y las referencias 0 psi se incluyeron e indican las células intactas totales antes del tratamiento a presión. Los datos mostrados en la Figura 5 indican que el tratamiento a presión hasta e incluyendo 275,6 bar (4000 psi) no produce lisis celular en comparación con el cultivo recogido y la referencia 0 psi. En cambio, el aumento de la presión a 551,2 bar (8000 psi) produce un aumento de absorción de yoduro de propidio y, por tanto, alguna lisis celular.
- 25
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende cultivar una muestra de célula hospedadora de *E. coli* transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante que se expresa en el periplasma de la célula hospedadora y someter dicha muestra de célula hospedadora a una etapa de tratamiento térmico, caracterizada porque dicha muestra se somete a una etapa de tratamiento no lisante a presión entre 1000 psi (68,9 bar) y 4000 psi (275,8 bar) antes de someterse a un aumento de temperatura dentro del intervalo de 30°C a 70°C durante un periodo de hasta 24 horas.
2. El método según la reivindicación 1 en el que el anticuerpo está humanizado, es híbrido o injertado con CDR.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un fragmento Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ monocatenario o un fragmento de unión al epítipo de éste.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento a presión se realiza a 2000 psi (137,9 bar).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende al menos una etapa de purificación, realizándose dicha etapa de purificación después de la etapa de tratamiento térmico.

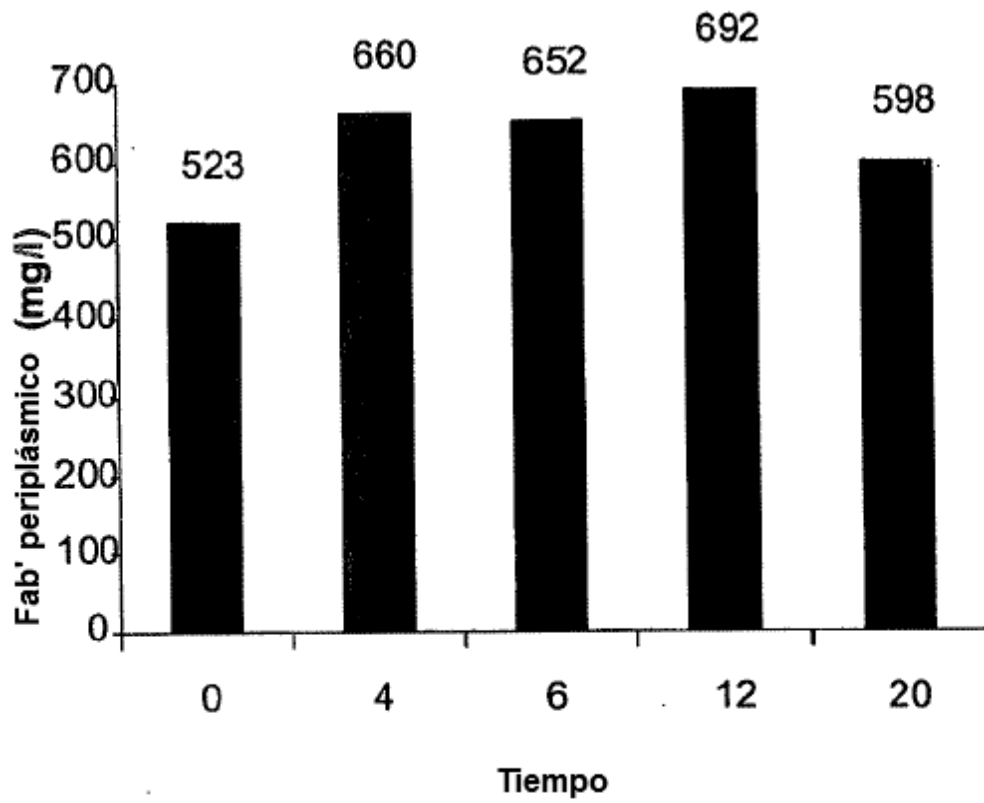


Figura 1

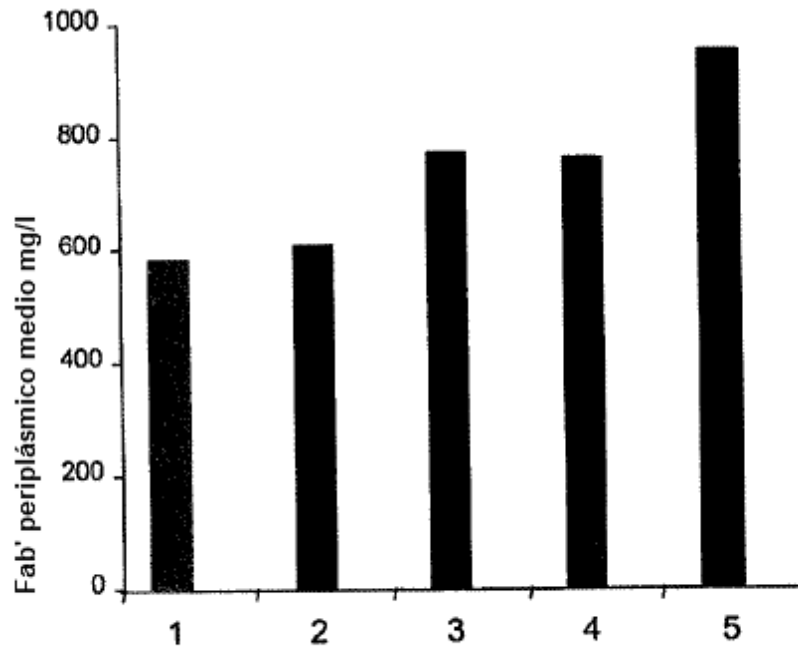
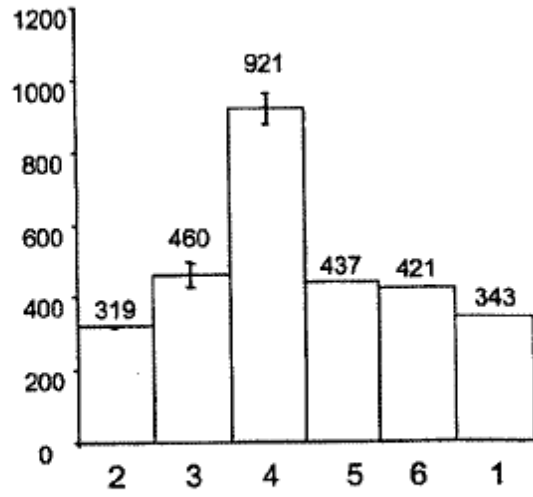


Figura 2

(a)



(b)

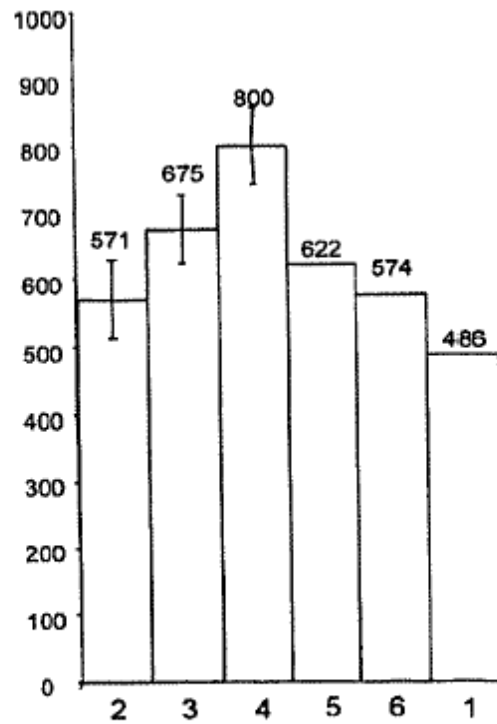


Figura 3

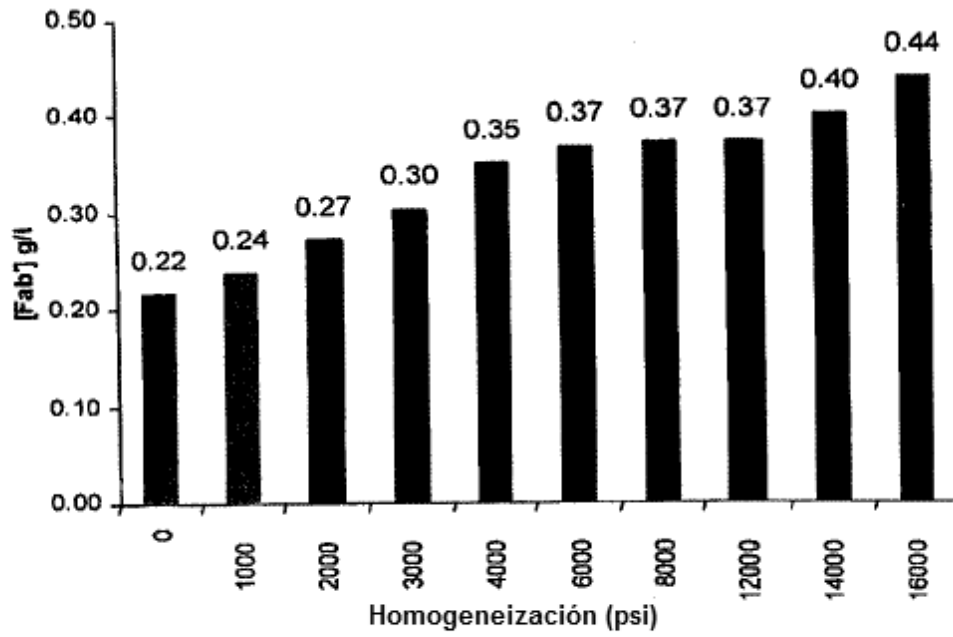


Figura 4a

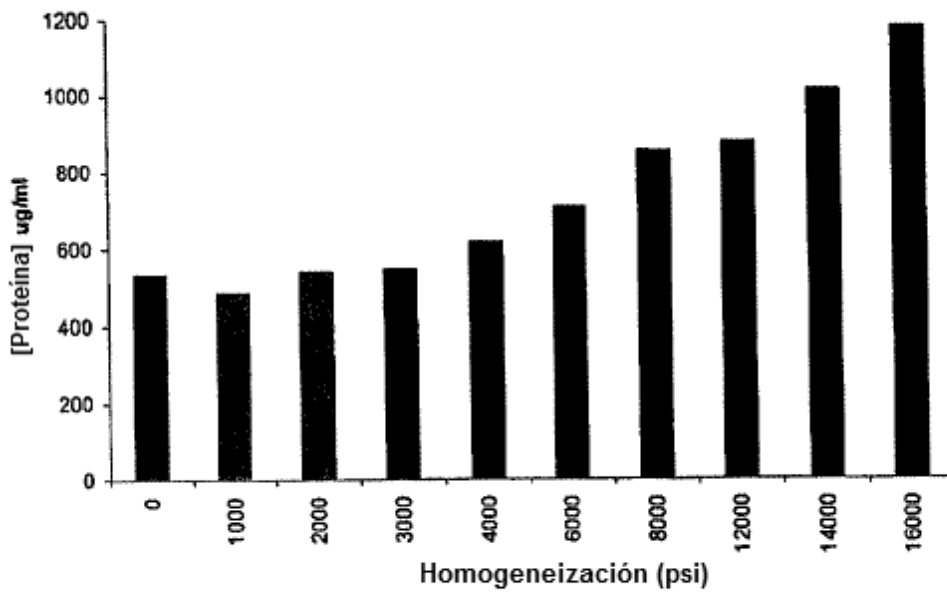


Figura 4b

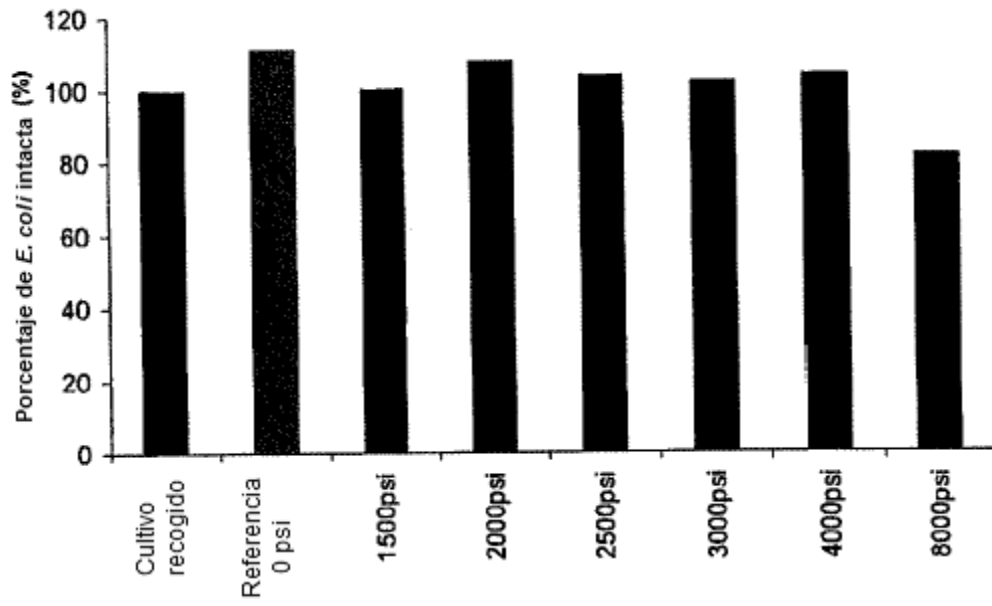


Figura 5