



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 929**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06022818 .6**
96 Fecha de presentación : **05.04.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1752465**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Fragmento de anticuerpo de cadena pesada V_H-C_H1-V_H-C_H1 lineal.**

30 Prioridad: **20.04.1995 US 425763**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Rinderknecht, Ernst H. y**
Zapata, Gerardo A.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 365 929 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

Fragmento de anticuerpo de cadena pesada v_h - c_h1 - v_h - c_h1 lineal

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

5 **[0001]** Esta invención se refiere, en general, a la purificación de anticuerpos. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para recuperar un fragmento de anticuerpo de las variantes, impurezas y contaminantes asociados a él.

Descripción de la técnica relacionada

10 **[0002]** La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una herramienta útil para separar moléculas en base a su hidrofobicidad. Generalmente, las moléculas de la muestra se cargan en una columna de HIC en un tampón de salinidad elevada. La sal en la solución tampón interacciona con las moléculas de agua para reducir la solvatación de las moléculas en solución, debido a eso se exponen las regiones hidrofóbicas en las moléculas de la muestra que son por lo tanto absorbidas por la columna de HIC. Cuanto mas hidrofóbicas sean las moléculas, menos sal se necesita para promover la asociación. Normalmente, se utiliza un gradiente salino decreciente para separar las muestras de la columna. A medida que disminuye la fuerza iónica, aumenta la exposición de las regiones hidrofóbicas de las moléculas y las moléculas se separan de la columna para aumentar la hidrofobia. Se puede conseguir también la separación de la muestra añadiendo al tampón de elución modificadores orgánicos o detergentes suaves. La HIC es revisada en Protein Purification 2d Ed., Springer-Verlag. New York, pgs. 176-179(1988).

20 **[0003]** La HIC ha sido utilizada por varios investigadores para la purificación de anticuerpos. Danielsson *et al.*, Journal of Immunological Methods **115**:79-88 (1988) encontró que la HIC era particularmente útil en la purificación de anticuerpos monoclonales de las ascitis del ratón cuando el punto isoelectrico de los anticuerpos estaba por debajo de 7,2. Se hizo la HIC con una columna de "Alkyl Superose HR™". El sistema tampón fue fosfato de 0,1M, con la adición de sulfato de amonio. Normalmente, el tampón inicial contenía sulfato de amonio 2M. Bridonneau *et al.*, Journal of Chromatography **616**: 197-204 (1993) estaban interesados en determinar, si se podía o no utilizar diferentes columnas HIC para la purificación selectiva de las subclases de la inmunoglobulina G humana (1gG). Los anticuerpos se adsorbieron en columnas de Fenil-, Butil-, u Octil-Sefarosa™ en sulfato de amonio (pH 7,0) y se separaron con un gradiente salino decreciente. El medio de Octil-Sefarosa™ produjo una fracción pobremente absorbida algo enriquecida en IgG_{2a}. Ver también Berkovich *et al.*, Journal of Chromatography **389**:317-321 (1987); Gagnon *et al.*(90th Annual Meeting, American Society for Microbiology, Anaheim, May 13-17, 1990) Abstract No. 0-4; Johansson *et al.* Biol. Recombinant Microorg. Anim. Cells, (Oholo 34 Meeting), 409-414 (1991); Pavlu *et al.*, Journal of Chromatography **359**:449-460 (1986) y Abe *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **27**:215-227(1993) sobre HIC de anticuerpos.

30 **[0004]** La HIC ha sido también utilizada para purificar fragmentos de anticuerpo. Inouye *et al.*, Protein Engineering pgs. 6, 8 y 1018-1019 (1993); Inouye *et al.*, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects **5**:609-616(1993); Inouye *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **26**:27-39 (1993) y Marimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **24**:107-117 (1992) prepararon fragmentos F(ab')₂ digiriendo con pepsina anticuerpos monoclonales IgM de ratón utilizando una columna HIC de gel TSK Ether-5PW™. Los fragmentos de anticuerpos fueron salados con sulfato de amonio al 60% y los precipitados se disolvieron en un salino tamponado de fosfato (PBS, pH 7,4) que contenía sulfato de amonio 1M. Esta solución fue cargada en una columna HIC que había sido equilibrada con PBS que contenía también sulfato de amonio 1M. Los fragmentos F(ab')₂ que se adsorbieron en la columna fueron separados reduciendo en el tampón de elución la concentración de sulfato de amonio a 0 M. Inouye *et al.* encontraron que la fracción que contenía el F(ab')₂ era homogénea tanto mediante SDS-PAGE como mediante HPLC de filtración en gel. El procedimiento era adecuado para la purificación a gran escala de fragmentos de F(ab')₂. Del mismo modo, Rea *et al.*, Journal of Cell, Biochem. Suppl. **0**, Abstract No. X1-206 (17 Part A), p.50 (1993) evaluaron la HIC para la purificación de un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión péptica de un anticuerpo IgG_{2a} monoclonal de murina. La etapa de HIC precedió a la purificación de la proteína A para eliminar el anticuerpo residual intacto. Se probó para diferentes sales y pHs el funcionamiento de la purificación en tres columnas diferentes de HIC. Hallaron que la columna de POROS PE™ (fenil éter) era la mejor y que el sulfato de sodio tamponado con en fosfato a pH 8 dio la mejor resolución del fragmento de F(ab')₂.

40 **[0005]** EP 0517024 A2 (Behringwerke AG), se refiere a receptores biespecificos tetravalentes, a su preparación y usos.

50 **[0006]** Mallender *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, vol 269 no. 1: 199-206 (1994), describe la construcción, expresión y actividad de un anticuerpo de cadena simple biespecifico bivalente.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

55 **[0007]** En comparación con las técnicas HIC descritas arriba, que se llevan a cabo generalmente a un pH aproximadamente neutro en presencia de altas concentraciones de sal (utilizando un gradiente de sal para eluir el anticuerpo), la presente descripción se refiere a cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo (LPHIC) para la purificación de anticuerpos. Preferentemente, la LPHIC se lleva a cabo a bajas concentraciones de sales, por ejemplo alrededor de 0-0.25M de sal, preferentemente alrededor de 0-0.1M de sal y más preferentemente a 0-50mM de sal. Esta

baja concentración de sal también aplica al tampón de carga. Preferentemente, no se usa gradiente de sal para eluir el anticuerpo.

[0008] Se describe aquí un proceso para purificar un anticuerpo de un contaminante que comprende cargar una mezcla que contiene el anticuerpo y el contaminante en una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica y eluir el anticuerpo de la columna con un tampón que tenga un pH de alrededor 2.5-4.5. Preferentemente el tampón está a un pH de alrededor de 2.8-3.5 y más preferentemente a un pH de alrededor de 3.1. Habitualmente, la mezcla cargada en la columna está al mismo pH que el tampón de elución.

[0009] El método es particularmente útil para purificar fragmentos de anticuerpos, especialmente fragmentos de anticuerpos unidos por disulfuros y correctamente plegados (p.ej. fragmentos Fab) de fragmentos de anticuerpo contaminantes que no están plegados correctamente y/o unidos por disulfuros. Los inventores han identificado un problema asociado con la formación de inmunoglobulinas recombinantes. Se ha observado que dicha producción resulta en la formación de anticuerpos funcionales F(ab')₂, así como una variedad de fragmentos pesados y ligeros asociados incorrectamente. La impureza más difícil de eliminar ha sido identificada aquí como un fragmento de anticuerpo correctamente plegado, cuyas cadenas pesada y ligera no se asocian mediante enlace disulfuro. Esta impureza de anticuerpo puede detectarse por geles SDS PAGE y HPLC de fase reversa como cadenas ligera y pesada. La LPHIC descrita aquí aporta medios para remover sustancialmente este contaminante de composiciones parcialmente purificadas derivadas de células huésped que producen el fragmento de anticuerpo recombinante, aunque no se limita a la purificación de productos recombinantes.

[0010] La invención se refiere a la formulación de anticuerpo preparada por el procedimiento y a usos para esta formulación de anticuerpo. En particular, tal como se muestra en las reivindicaciones, la invención aporta un anticuerpo que comprende un fragmento de cadena pesada V_H-C_H1-V_H-C_H1 lineal asociado con dos fragmentos de cadena ligera, donde el extremo C-terminal de C_H1 está unido directamente, sin ninguna secuencia de proteína de unión externa, al extremo N-terminal de V_H en la unión Fd-Fd del fragmento de la cadena pesada; un ácido nucleico que codifica por el fragmento de cadena pesada; y un método para la preparación de dicho anticuerpo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

La Fig.1 muestra un típico flujo a través del cromatograma de cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo (ver ejemplo 1). La columna era operativa en el modo de flujo continuo. El fragmento de anticuerpo plegado correctamente, unido a disulfuro circula a través de ella. La cadena ligera, la cadena pesada, los agregados ligeros-pesados y las especies de fragmentos de anticuerpo no ligados a disulfuro quedan pegados a la columna. El pico 1 es el flujo continuo después de un lavado con agua, el pico 2 es el lavado con urea de las especies unidas.

La Fig. 2 representa el análisis de HPLC de Fase Inversa de ABX™ y conjuntos de Fenil Sefarosa de flujo rápido (FF) de fragmento de anticuerpo anti-CD18 MHM23. Cromatograma 1; el conjunto ABX™ que contiene los contaminantes de cadena ligera y pesada presentes antes de la purificación con LPHIC. Cromatograma 2; purificación con LPHIC. Cromatograma 3; análisis de Fase inversa del tampón de regeneración de la columna que contiene impurezas de cadena ligera y pesada y los fragmentos de anticuerpo retenidos por la columna fenil Sepharosa de flujo rápido.

Las Figs. 3A a 3D representan los espectros de UV cercano y UV lejano de dos fragmentos de anticuerpos, rhuMAbH52OZG1 y rhuMAbH52OZG2, obtenidos por dicroísmo circular. La Fig. 3A representa los espectros de UV cercano de rhuMAbH52OZG2, y la Fig. 3B representa los espectros de UV lejano de rhuMAbH52OZG2. Este anticuerpo es un mutante de rhuMAb H52OZG1 en el cual los residuos 215 y 228 de cisteína, implicados en el enlace disulfuro entre cadenas ligeras y pesadas, se mutaron a residuos de serina. Los espectros de dicroísmo circular en ambas regiones, UV lejano y cercano, mostraron un punto de transición alrededor del pH 3,2 (línea gruesa). Una punta de transición representa un cambio del fragmento de anticuerpo plegado, a su estado desplegado. La Fig. 3C es un espectro de UV cercano de rhuMAb H52OZG y la Fig. 3D es un espectro de UV lejano rhuMAb H52OZG1. Este fragmento de anticuerpo muestra un punto diferente de transición a pH 2,5 (línea gruesa).

La Fig. 4 es una gráfica de barras que representa las consecuencias sobre el rendimiento del producto al variar el pH de la HIC. El ABX™ purificó el conjunto de fragmentos de anticuerpo que contenían impurezas de anticuerpo sin enlaces (i.e. sin enlace disulfuro entre la cadena pesada y la ligera) se purificaron en una columna Fenil-Sepharosa™ de flujo rápido. Se efectuó la purificación a valores de pH entre 3,0 y 6,5 con el fin de determinar el mejor pH para obtener el máximo rendimiento y pureza. Se realizó el análisis de flujo a través de los conjuntos utilizando la HPLC de Fase Inversa. Se puede ver en la grafica de barras que el pH 3,1 el mejor valor para maximizar tanto la pureza como el rendimiento de la purificación del fragmento del anticuerpo rhuMAb H52OZG1.

Las Figs. 5A y 5B representan el diseño de L-F(ab')₂ y el cassette de expresión del ejemplo 2 aquí descrito. La Fig. 5A es una representación esquemática de las variantes L-F(ab')₂ (v1, v2 y v3) en los que los dominios variables (v) de anti-p185^{HER2} Ab, huMAb4D5-8, y de anti-CD18Ab, huMAbH52OZG1, están representados por los recuadros en blanco y en negro, respectivamente. La Fig. 5B es una representación esquemática de un operón dicistrónico para la expresión de las variantes anti-p185^{HER2} L-F(ab')₂ derivadas del plásmido pAK19. La expresión está bajo el control transcripcional del promotor de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (phoA), que es inducible por agotamiento de fosfato. Cada cadena de anticuerpo viene precedida por la secuencia señal de la enterotoxina II termoestable (stII) para dirigir la secreción hacia

el espacio periplasmático de *E. coli*. Los dominios humanizados V_L y V_H (ambas copias) se fusionan de manera precisa en su lado 3' a los dominios humanos constantes $\kappa_1 C_L$ y IgG_1C_H1 , respectivamente. La cadena H comprende los segmentos duplicados en tándem en los que el dominio 5' C_H1 se une en a la estructura del segmento codificado V_H . El dominio 3' C_H1 es seguido por el terminador transcripcional del bacteriófago lambda t_0 (ter).

- 5 Las Figs. 6A-6C representan el análisis de la cromatografía por exclusión de tamaño del anti-p185^{HER2}. La Fig. 6A muestra el L-F(ab')₂ v1; La fig. 6B muestra el tioeter unido a F(ab')₂ y la Fig. 6C muestra la titración de Fab con el dominio extracelular de p 185^{HER2} (ECD).

- 10 La Fig. 7 muestra la inhibición de la proliferación de células BT474 por parte de los fragmentos de L-F(ab')₂ del anti-p185^{HER2}, F(ab')₂ y Fab. Los datos mostrados aquí están presentados como el porcentaje de resultados de cultivos no tratados (media de las mediciones por duplicado y representativas de tres experimentos separados). Los fragmentos mono y bivalentes son estudiados por titración con ECD de p185^{HER2} y filtración en gel, están representados por símbolos abiertos y cerrados, respectivamente.

- 15 La Fig. 8 representa la farmacocinética de los fragmentos anti-p185^{HER2} L-F(ab')₂ v1, Fab y F(ab')₂ unidos a tioéter de ratones normales. Se consiguieron las muestras de suero a partir de una sola inyección (10mg/kg) en la vena de la cola de grupos de 45 ratones hembra CD-1. Las concentraciones de suero de media ($C_t \pm SD$) estimadas mediante ELISA de unión a antígeno (Ag), se muestran juntas en los recuadros menores no lineales.

$$C_t = 155e^{-1,73t} + 190e^{-0,042t}, \text{ L-F(ab')}_2 \text{ v1};$$

$$C_t = 239e^{-0,704t} + 38,4e^{-0,264t}, \text{ F(ab')}_2;$$

$$C_t = 440e^{-4,99t} + 2,69e^{-0,442t}, \text{ Fab.}$$

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Definiciones

- 25 **[0012]** El término "anticuerpo" es utilizado en su significado más amplio y cubre específicamente los anticuerpos intactos monoclonales (incluyendo los anticuerpos agonistas y antagonistas), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p.e. anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos 2 anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpo de manera que tengan la actividad biológica deseada.

[0013] "Fragmentos de anticuerpo" comprende una porción del anticuerpo intacto, generalmente la asociación con el antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; los "diacuerpos" ("diabodies"); los anticuerpos lineales (véase Ejemplo 2); moléculas de anticuerpo de cadena única; y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

- 30 **[0014]** El término "anticuerpo monoclonal" usado en el presente documento se refiere al anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, p.e. los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto aquellas posibles mutaciones ocurridas de manera natural que pueden estar presentes en menor cantidad. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen directamente contra un solo sitio antigénico. Además, en contraposición con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto en cuanto son sintetizados a partir de un cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica la característica del anticuerpo cuando se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpreta como una producción requerida del anticuerpo a partir de algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención se obtienen a partir del procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature*, **256**:495 (1975), o se obtienen a partir de procedimientos de ADN recombinante (ver, p.e., U.S. Patent No. 4,816,567 [Cabilly *et al.*]). Los "anticuerpos monoclonales" pueden ser aislados a partir de librerías de fago-anticuerpo utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, **352**:624-628 (1991) y en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**:581-597 (1991), por ejemplo.

- 45 **[0015]** Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes a anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras el resto de cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes a anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, y así hasta obtener la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, *supra*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 [1984]).

- 55 **[0016]** Las formas "Humanizada" de anticuerpos no humanos (p.e. murina) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) de un receptor son reemplazados por residuos de CDR de especies no

humanas (anticuerpo donante) tales como el ratón, la rata o el conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada, ni en las secuencias del armazón. Se hacen estas modificaciones para refinar y optimizar aún más la capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables en los que toda totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son aquellas de la secuencia de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también en condiciones óptimas por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles ver: Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 (1986); Richmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo *Primatized™* donde la región de la unión del antígeno al anticuerpo deriva de un anticuerpo producido por monos macacos inmunizados con el antígeno de interés.

[0017] El término "diacuerpos" ("*diabodies*") se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Utilizando un enlace que sea suficientemente corto para favorecer el emparejamiento de los dos dominios en la misma cadena, los dominios están forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los "diacuerpos" se describen en más detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993).

[0018] El "tampón" como se utiliza en este documento, se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes ácido-base conjugados. El tampón para la cromatografía de interacción hidrofóbica de esta invención tiene un pH en una escala de 2,5-4,5, preferentemente de aproximadamente 2,8-3,5. Ejemplos de tampones que controlan el pH en este intervalo incluyen los tampones de fosfato, acetato, citrato o amonio, o más de uno. De estos tampones los preferidos son los de citrato y los de amonio, con preferencia por los tampones de sulfato de amonio o de citrato de amonio. El "tampón de carga" es aquél que se usa para cargar la mezcla de anticuerpo y contaminante en la columna de HIC y el "tampón de elución" es aquél que se usa para eluir el anticuerpo de la columna. A menudo el tampón de carga y de elución serán el mismo.

[0019] Por "disulfuro correctamente unido" se entiende que todos los residuos de cisteína en el anticuerpo están asociados covalentemente como uniones disulfuro y estas asociaciones de disulfuro corresponden a las asociaciones disulfuro de la inmunoglobulina nativa. El diroísmo circular según se describe en el Ejemplo 1 se puede usar para determinar si un anticuerpo está o no unido correctamente al disulfuro siguiendo la integridad de la molécula bajo desnaturalización ácida. Un anticuerpo está "incorrectamente unido a disulfuro" cuando uno o más residuos de cisteína no están unidos por covalencia como uniones disulfuro o están asociados covalentemente con residuos de cisteína con los que habitualmente no están asociados en la inmunoglobulina nativa.

Modos de llevar a cabo la invención

[0020] El procedimiento del presente documento implica la purificación de un anticuerpo a partir de sus variantes relacionadas, normalmente, después de que el anticuerpo se haya purificado de muchas otras impurezas. Esta fase de la purificación puede ser la última antes de la formulación terapéutica o puede ser seguida por otra u otras etapas de purificación. Aunque el anticuerpo en la mezcla de variantes puede producirse a partir de cualquier fuente (p.e. escisión péptica de anticuerpos intactos). Se describen a continuación las técnicas de producción de anticuerpos, incluyendo las de fragmentos de anticuerpos.

I. Preparación del anticuerpo

(i) Anticuerpos policlonales

[0021] Los anticuerpos policlonales se desarrollan por lo general en animales a los que se les han administrado múltiples inyecciones subcutáneas (sc) intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y con un coadyuvante. Puede ser de utilidad asociar el antígeno pertinente a una proteína que sea inmunogénica en las especies a inmunizar, p.e. la hemocianina de lapa (*Keyhole limpet*), albúmina sérica, tiroglobulina bovina, el inhibidor de la tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o uno derivatizador, por ejemplo, del éster de la maleimidobenzoil sulfosuccinimida (asociación a través de residuos de cisteína), la N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), el glutaraldehído, el anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos de alquilo diferentes.

[0022] Los animales son inmunizados contra el antígeno, contra los conjugados inmunogénicos, o contra derivados combinando 1 mg o 1 μg del péptido o conjugado (para conejos y para ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund inyectando la solución en múltiples sitios por vía intradérmica. Un mes más tarde se reinyectan los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en coadyuvante completo de Freund, por vía subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después los animales se sangraron y se determinó en el suero el título de anticuerpos. Los animales fueron estimulados hasta que se estanca el título. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero asociado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Se pueden hacer también asociaciones en cultivos de células recombinantes como las fusiones de proteínas. También, agregar agentes tales como la alúmina, es apropiado para mejorar la respuesta

inmune.

(ii) Anticuerpos monoclonales

- 5 [0023] Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, p.e., los anticuerpos individuales incluidos en la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que suceden de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no pertenece a una mezcla de anticuerpos diferenciados.
- [0024] Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature, **256**:495 (1975), o se puede hacer con los procedimientos del ADN recombinante (Cabilly *et al.*, *supra*).
- 10 [0025] En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, es inmunizado de la manera arriba descrita para provocar que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces a la células del mieloma utilizando un agente de fusión apropiado, tal como el polietilenglicol para formar la célula hibridoma. (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 [Academia Press 1986]).
- 15 [0026] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo apropiado que contiene preferentemente una o mas sustancias que inhiben el crecimiento y la supervivencia de las células del mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de las células HGPRT deficientes.
- 20 [0027] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, sostienen un nivel elevado estable de producción de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio como es el medio HAT. De entre de estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma de murina, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Las líneas de células de mieloma humano y las de heteromieloma ratón-humano se han descrito también para la producción de anticuerpos humanos monoclonales (Kozbor, J. Immunol., **133**:3001 [1984]; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 [Marcel Dekker, Inc., New York, 1987]).
- 25 [0028] Se estudia el medio de cultivo en el cual las células de hibridoma están creciendo para producir anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).
- 30 [0029] La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, con el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., **107**:220 (1980).
- 35 [0030] Después de que las células de hibridoma se han identificado como productoras de anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitada e inducir su crecimiento con procedimientos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, los medios de D-MEM o de RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.
- 40 [0031] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, del fluido de ascitis o del suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, la "proteína A-Sephamse™", cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- 45 [0032] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (p.e., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de murina). Las células de hibridoma son las preferidas como fuente de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión, que luego son transfectados en células hospedadoras tales como las células de *E. Coli*, células COS de simio, células (CHO) de ovario de hámster chino, o células de mieloma que, por otra parte, no producen la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células recombinantes hospedadoras. Repaso de artículos sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluye Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., **5**:256-262 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs. **130**:151-188(1992).
- 50 [0033] En una realización adicional, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de librerías de fago-anticuerpo generada utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, **348**:552-554 (1990), utilizando el antígeno adecuado tal como CD11a, CD18, 1gE, o HER-2 para seleccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo adecuado. Clackson *et al.*, Nature, **352**:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., **222**:581-597 describen el
- 55

aislamiento de anticuerpos de murina y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango de nM) por intercambio de cadena (“*chain shuffling*”) (Mark *et al.*, *Bio/Technology*, **10**:779-783 [1992]), como también por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para crear unas librerías de fagos muy amplias (Waterhouse *et al.*, *Nuc.Acids. Res.*, **21**:2265-2266[1993]). De este modo estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma del anticuerpo monoclonal para aislar los anticuerpos “monoclonales”.

[0034] Se puede modificar, también, el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas por secuencias homólogas de murina (Cabilly *et al.*, *supra*; Morrison, *et al.*, *Proc. Nat.Acad.Sci.*, **81**:6851 [1984]), o uniéndolo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina, en su totalidad o parte de la secuencia codificante, de un polipéptido no inmunoglobulina.

[0035] Normalmente estos péptidos no inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables del sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

[0036] Se pueden preparar también anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que utilizan agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando una unión tioéter. Ejemplos de reactivos convenientes para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptoputirimidato.

[0037] Para aplicaciones diagnósticas, las variantes derivadas de anticuerpo del presente documento normalmente serán marcadas con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; marcadores isotópicos radiactivos, tales como, p.e. ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , o ^3H ; o un enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o peroxidasa de rábano.

[0038] Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la materia para conjugar separadamente la variante polipeptídica a la fracción detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, *Nature*, **144**:945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, **13**:1014 (1974); Pain *et al.*, *J.Immunol. Meth.*, **40**:219 (1981); y Nygren, *J.Histochem. and Cytochem.*, **30**:407 (1982).

(iii) Anticuerpos humanizados y humanos

[0039] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos a partir de una fuente no humana. A menudo estos residuos aminoácidos no humanos se conocen como residuos “importados”, que normalmente se extraen de un dominio variable “importado”. La humanización se consigue esencialmente utilizando el siguiente procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 [1986]; Richmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-327 [1988]; Verhoeven *et al.*, *Science*, **239**:1534-1536 [1988] por sustitución de las secuencias CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto estos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Cabilly *et al.*, *supra*), donde, sustancialmente, menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y probablemente algunos residuos de FR han sido sustituidos por residuos a partir de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

[0040] La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a ser utilizados en la preparación de anticuerpos humanizados, es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el también llamado procedimiento “ajuste óptimo”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba en toda la librería de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor es entonces aceptada como armazón humano (FR) para los anticuerpos humanizados (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2296 [1993]; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, **196**:901 [1987]). Otro procedimiento usa un armazón particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4285 [1992]; Presta *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2523 [1993])

[0041] Es muy importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de la alta afinidad por el antígeno y de otras propiedades favorables. Para conseguir este fin, de acuerdo a un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y de varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y de las humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas son comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Se dispone de programas de ordenador que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales en tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. El estudio de estos modelos visualizados permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p.e. el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias consenso importadas para conseguir la característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad aumentada para

el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión del antígeno.

5 **[0042]** Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (p.e. ratones) que son capaces, bajo inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes humanos de las inmunoglobulinas de la línea germinal de manera que los ratones mutantes de la línea germinal resulten en la producción de anticuerpos humanos cuando sean desafiados con el antígeno. Ver, p.e., Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**:2551-255 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, **362**:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., **7**:33(1993). Los anticuerpos humanos pueden ser producidos también mediante librerías de exposiciones de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., **227**:381 [1991]; Marks *et al.*, J. Mol. Biol., **222**:581 [1991]).

(iv) Fragmentos de anticuerpo

15 **[0043]** Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos procedían de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, p.e., Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **24**:107-117 [1992] y Brennan *et al.*, Science, **229**:81 [1985]). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por células recombinantes hospedadoras. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las librerías de fagos arriba descritas. Por otra parte, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y emparejar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology **10**:163-167 [1992]). Por otra parte, se pueden aislar los fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células recombinantes hospedadoras. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serían evidentes para el médico experto.

(v) Anticuerpos biespecíficos

25 **[0044]** Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (p.e. anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

30 **[0045]** Se conocen en la materia procedimientos para hacer anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa está basada en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-de cadena pesada de inmunoglobulinas, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y Cuello, Nature, **305**:537-539 [1983]). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas ("quadromas") producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares están descritos en WO 93/08829, publicado el 13 de Mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., **10**:3655-3659 (1991).

35 **[0046]** De acuerdo con una aproximación diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con la especificidad de unión deseada (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente tiene lugar con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, regiones C_H2, C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y son co-transfectados en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

40 **[0047]** En una realización preferida de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma de separación fácil. Esta aproximación está descrita en WO 94/04690 publicada el 3 de marzo, 1994. Para más detalles sobre la formación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, **121**:210 (1986).

45 **[0048]** Los anticuerpos biespecíficos incluyen los anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, y el otro a biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (patente US No. 4.4676.980), y para el tratamiento de la infección por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Se pueden preparar

anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier procedimiento conveniente de reticulación. Se conocen bien en la materia agentes de reticulación adecuados, y se describen en la patente US No. 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

5 [0049] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo se describen también en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando la unión química. Brennan *et al.*, Science **229**:81 (1985) describen un procedimiento donde anticuerpos intactos son cortados por proteólisis para conseguir fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia del agente tiol de complejación, arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte, a continuación, en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el BsAb. Se utilizan los BsAg producidos como agentes de inmovilización selectiva de enzimas.

15 [0050] El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, los cuales se pueden emparejar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., **175**:217-225 (1992) describen la producción de una molécula completamente humanizada de BsAg F(ab')₂. Cada fragmento Fab' fue secretado separadamente de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el BsAg. El BsAg así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, además de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de pecho. Ver también Rodríguez *et al.*, Int. J. Cancers, (Suppl.) **7**:45-50 (1992).

20 [0051] Han sido descritas también varias técnicas para producir y aislar fragmentos BsAg directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, los heterodímeros biespecíficos F(ab')₂ se producen utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. **148**:1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron a la región bisagra para formar monómeros y a continuación se reoxidaron para formar heterodímeros de anticuerpo. La tecnología del diacuerpo descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **90**:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos BsAb. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y el V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, de ese modo se forman dos sitios de unión a antígeno. Se ha descrito también otra estrategia para hacer fragmentos BsAb utilizando dímeros de una sola cadena Fv (sFv). Ver Gruber *et al.*, J. Immunol. **152**:5368 (1994). Estos investigadores diseñaron un anticuerpo que comprendía los dominios V_H y V_L de un primer anticuerpo unidos por un engarce de 25 aminoácidos a los dominios V_H y V_L de un segundo anticuerpo. La molécula replegada se unió a fluoresceína y al receptor de célula T y se redirigió la lisis de las células del tumor humano que tenían la fluoresceína unida covalentemente a su superficie.

2. Purificación del anticuerpo

[0052] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplasmático, o se puede secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, en un primer paso, el debris de partículas, ya sean las células hospedadoras o los fragmentos resultantes de la lisis, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o por ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology **10**:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplasmático de *E. Coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), de EDTA, y de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante unos 30 min. El debris celular se puede eliminar por centrifugación. Cuando se secreta el anticuerpo en el medio, los sobrenadantes procedentes de tales sistemas de expresión generalmente primero se concentran utilizando un filtro comercialmente disponible de concentración de proteína, por ejemplo, un Amicon o una unidad de ultrafiltración Millipore Pellicon. Un inhibidor de la proteasa como el PMSF puede incluirse en cualquiera de los siguientes pasos para inhibir la proteólisis y los antibióticos se pueden incluir para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

[0053] La composición de anticuerpos preparados a partir de células se somete preferentemente a, por lo menos, una etapa de purificación antes de LPHIC. Ejemplos de etapas de purificación adecuadas incluyen la cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isótopo de cada dominio Fc de inmunoglobulina presente en el anticuerpo. Se puede utilizar la proteína A para purificar anticuerpos basados en las cadenas pesadas de γ 1, de γ 2, o de γ 4 (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. **62**:1-13 [1983]). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para la γ 3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. **5**:1567-1575 [1986]). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es a menudo la agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables como son el cristal de poro controlado y el poli(estirenodivinil)benceno consiguen un flujo más rápido y unos tiempos del procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la purificación con resina de Bakerbound ABX™ es útil (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). También hay disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas dependiendo del anticuerpo a recuperar tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en silicio, cromatografía en Sefarosa™ de heparina, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o de catiónica (como la columna de ácido poliaspártico),

cromatoenfoco, la SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio.

[0054] Después de cualquiera de la(s) etapa(s) de purificación preliminares, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y el/los contaminante(s) se somete a LPHIC. A menudo, la composición del anticuerpo a purificar, estará presente en un tampón de la etapa previa de purificación. Sin embargo, puede ser necesario añadir un tampón a la composición de anticuerpo antes de la etapa de LPHIC. Muchos tampones están disponibles y se pueden seleccionar con una experimentación de rutina. El pH de la mezcla que comprende el anticuerpo a purificar y al menos un contaminante en un tampón de carga se ajusta a un pH de aproximadamente 2,5-4,5 utilizando un ácido o una base, dependiendo del pH inicial. Preferentemente, el tampón de carga tiene una concentración salina baja (p.e. menos de aproximadamente 0,25 M de sal).

[0055] La mezcla se carga en la columna de HIC. Las columnas de HIC normalmente comprenden una matriz base (p.e. agarosa reticulada, o material de un copolímero sintético) a cuyos ligandos hidrofóbicos (p.e. grupos alquilo o arilo) se acoplan. La columna de HIC preferida contiene una resina de agarosa sustituida por grupos fenilo (p.e. una columna Fenil Sefarosa™). Muchas columnas de HIC están disponibles comercialmente. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, columna de flujo rápido fenil Sefarosa™ 6 con sustitución baja o alta (Farmacia LKB Biothecology, AB, Sweden); columna de Fenil Sefarosa™ de alta resolución (Farmacia LKB, Biothecology, AB, Sweden); columna de Octil Sefarosa™ de alta resolución (Farmacia LKB, Biothecology, AB, Sweden); columnas de Fractogel™ EMD Propil o de Fractogel™ EMD fenil (E. Merck, Germany); soportes de t-butilo Macro-Prep™ Metil o Macro-Prep™ (Rio-Rad, California); columna de WP HI-Propil (C₃)™ (J.T. Baker, New Jersey); y columnas de éter, de fenilo o de butilo Toyopearl™ (TosoHaas, PA).

[0056] El anticuerpo se eluye de la columna usando un tampón de elución que normalmente es el mismo que el tampón de carga. Se puede usar experimentaciones de rutina para seleccionar el tampón de elución. El pH del tampón de elución está entre aproximadamente 2,5-4,5 y tiene una concentración salina baja (p.e. inferior a aproximadamente 0,25 M de sal). Se ha descubierto que no es necesario usar un gradiente de sal para eluir el anticuerpo en estudio; el producto deseado se recupera en el flujo a través de una fracción que no se une significativamente a la columna.

[0057] La etapa de LPHIC proporciona una manera de eliminar el anticuerpo correctamente plegado y unido a disulfuro de contaminantes no deseados (p.e. fragmentos ligeros y pesados incorrectamente unidos). En particular, el procedimiento proporciona una manera para eliminar de manera sustancial una impureza caracterizada en el presente documento como un fragmento de anticuerpo correctamente plegado cuyas cadenas ligera y pesada acaban uniéndose a través del enlace disulfuro. Se ha descubierto que la composición de anticuerpos preparada utilizando la LPHIC descrita en el presente documento es al menos un 95% puro. Se han conseguido puridades de más del 98% utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

[0058] La composición de anticuerpo preparada por LPHIC se puede purificar tanto como se desee utilizando técnicas bien conocidas en la materia. Las formulaciones terapéuticas o diagnósticas de la proteína purificada se pueden preparar proporcionando la composición del anticuerpo en un portador fisiológicamente aceptable, ejemplos de los cuales se proporcionan más abajo.

[0059] Para eliminar contaminantes (p.e. anticuerpo no plegado y fragmentos pesados y ligeros incorrectamente asociados) de la columna HIC para poderlos reutilizar, se puede pasar a través de la columna una composición que incluya urea (p.e. 6,0 M de urea, 1% de tampón MES pH 6,0, 4mM de sulfato de amonio).

3. Usos del Anticuerpo Purificado

[0060] Se contemplan muchos usos de anticuerpos que se han purificado con el procedimiento descrito, incluyendo los usos diagnósticos y terapéuticos. Varios de los usos de anticuerpos para el diagnóstico y terapia han sido examinados en Goldenberg *et al.*, Semin. Cancer Biol. 1(3): 217-225 (1990), Beck *et al.*, Semin. Cancer Biol. 1(3):181-188 (1990), Niman, Immunol.Ser. 53:189-204 (1990) y Endo, Nippon Igatu Hoshasen Gakkai Zasshi (Japan) 50(8):901-909 (1990), por ejemplo.

[0061] Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar en inmunoensayos, como inmunoensayos con enzimas. Los BsAb son particularmente útiles para este tipo de ensayo: un brazo del BsAb se puede diseñar para unirse a un epítipo específico en el enzima de manera que la unión no cause inhibición enzimática, el otro brazo del anticuerpo se puede diseñar para unirse a una matriz inmovilizadora que asegura una alta densidad del enzima en el sitio deseado. Ejemplos de tales BsAbs para el diagnóstico incluyen aquellos que tienen especificidad tanto para IgG así como para ferritina, y aquellos que tienen especificidad de unión para la peroxidasa de rábano (HRP) así como para una hormona, por ejemplo.

[0062] Los anticuerpos se pueden diseñar para usarlos en inmunoensayos de dos sitios. Por ejemplo, se producen dos anticuerpos uniendo los dos epítopos separados en la proteína analito; un anticuerpo une complejo a una matriz insoluble, el otro une un enzima indicador.

[0063] Se pueden usar anticuerpos para inmunodiagnos *in vitro* o *in vivo* de varias enfermedades tales como el cáncer. Para facilitar este uso diagnóstico, un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumor se puede conjugar con un marcador detectable (p.e. un quelante que se une a un radionúclido). Por ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por el antígeno asociado a tumor CEA se puede usar para visualizar los carcinomas colorrectales y de

tiroides. El anticuerpo anti-p185^{HER2} descrito en el presente documento se puede usar para detectar cánceres caracterizados por una ampliación del protooncogen HER2. Otros usos diagnósticos del anticuerpo, no terapéuticos, serán evidentes para el experto en la materia.

[0064] Para aplicaciones diagnósticas, normalmente el anticuerpo se marca con un fragmento detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, tanto directa como indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, tales como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I; un compuesto fluorescente o quimiluminiscente, tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o un enzima, tales como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o HRP.

[0065] Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la materia para conjugar separadamente el anticuerpo a una fracción detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, *Nature* **144**:945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry* **13**:1014 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.* **40**:219 (1981); y Nigren, *J.Histochem. and Cytochem.* **30**:407 (1982).

[0066] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo "sandwich" indirectos y directos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

[0067] Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado en competir con un analito de la muestra de ensayo a ser analizada para unirse a una cantidad limitada de anticuerpos. La cantidad de analito en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se va uniendo al anticuerpo. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se va uniendo, el anticuerpo por lo general se insolubiliza antes o después de la competición, de manera que el patrón y analito que se unen al anticuerpo se pueden separar convenientemente del patrón y analito que quedan sin unirse.

[0068] Los BsAbs son particularmente útiles en los ensayos sándwich que implican el uso de dos moléculas, cada una capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la muestra a detectar. En un ensayo sándwich, el analito de la muestra a analizar se une a un primer brazo del anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y después un segundo brazo del anticuerpo se une al analito, formándose de este modo un complejo de tres partes insoluble. Ver, p.e., patente US No. 4.376.110. El segundo brazo del anticuerpo se puede marcar con una fracción detectable (ensayos sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con una fracción detectable (ensayo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso la fracción detectable es un enzima.

[0069] Los anticuerpos también son útiles para la purificación por afinidad de un antígeno de interés a partir de un cultivo de células recombinantes o fuentes naturales.

[0070] Se consideran también usos terapéuticos de los anticuerpos purificados utilizando el procedimiento descrito en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo se puede utilizar para la citotoxicidad redirigida (p.e. para matar células tumorales), como un adyuvante de vacuna, para la liberación de agentes trombolíticos a coágulos, para la liberación de inmunotoxinas a células tumorales, convirtiendo profármacos de enzima en un sitio diana (p.e. un tumor), para tratar enfermedades infecciosas o dirigir complejos inmunes a receptores de la superficie celular. Se preparan formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo con el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A., Ed., [1980]), en forma de torta liofilizada o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina en suero, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos como la polivinilpirrolidona: ácidos amino tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina: monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes del azúcar tales como el manitol o el sorbitol: contraiones formadores de sal tales como el sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic, o polietilenglicol (PEG).

[0071] El anticuerpo se puede inmovilizar también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de polimetilmetacrilato, respectivamente), en sistemas de liberación coloidal de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*.

[0072] El anticuerpo a ser utilizado para su administración *in vivo* tiene que ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración, a través de membranas estériles de filtración, antes o después de liofilización y reconstrucción. Normalmente el anticuerpo se almacenará en forma liofilizada o en solución.

[0073] Las composiciones terapéuticas de anticuerpo se colocan generalmente en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de una solución intravenosa que tiene un cierre perforable con una aguja inyección hipodérmica.

[0074] La ruta de administración de anticuerpos es la acordada en los procedimientos conocidos, p.e. inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida como los indicados abajo. El anticuerpo se administra continuamente por infusión o por inyección en bolo.

5 [0075] Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen la proteína, estas matrices tienen la forma de artículos, p.e. películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles [p.e. poli(2-hidroxietilmetacrilato) como los descritos por Langer *et al.*, *J.Biomed. Mater. Res.* **15**:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.* **12**:98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)], poliláctidos (patente U.S. No. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros del ácido L-glutámico y poliláctidos de gama etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* **22**:547-556[1983]), vinilacetato de etileno no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico (EP 133.988).

15 [0076] Aunque polímeros tales como acetato de etilenvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando anticuerpos encapsulados quedan en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición de la mezcla a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para estabilizar el anticuerpo dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación intermolecular de un enlace S-S a través de intercambio tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando los residuos sulfidril, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando los aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

20 [0077] Las composiciones de liberación sostenida de anticuerpos también incluyen anticuerpos inmovilizados en liposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo mediante procedimientos conocidos *per se*: DE 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes US Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324. Normalmente los liposomas son de tipo unilaminar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido de lípido es superior a aproximadamente 30 mol. % de colesterol, siendo ajustada la proporción seleccionada para una terapia óptima con anticuerpo.

30 [0078] Una cantidad efectiva de anticuerpo a ser utilizada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y la condición del paciente. En consecuencia, será necesario para el terapeuta determinar la dosis y modificar la ruta de administración, según se requiera, para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg hasta 10 mg/kg o más, dependiendo de los factores arriba mencionados. Normalmente el clínico administrará el anticuerpo hasta llegar a una dosis que consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se sigue fácilmente con ensayos convencionales.

[0079] Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo ilustrativo y no limitativo.

EJEMPLO 1

CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA A pH BAJO (LPHIC)

40 [0080] Se ha desarrollado un procedimiento para desplegar el anticuerpo no unido a disulfuro por desnaturalización ácida. Durante la desnaturalización ácida, la repulsión intramolecular de la carga contribuye al desplegamiento y el grado de desplegamiento depende tanto de las condiciones de acidificación como de la estructura de la proteína. A pH bajo, el anticuerpo desplegado y los fragmentos ligeros y pesados asociados incorrectamente se pueden separar por LPHIC (modo a través de flujo). Las especies de anticuerpo no deseadas se unen a la columna mientras que los fragmentos de anticuerpo deseados fluyen a través de ella. Las impurezas se eliminan de la columna con urea 6,0 M, tampón MES al 1% (pH 6.0), sulfato de amonio 4mM.

[0081] Los siguientes anticuerpos se sometieron a la LPHIC:

- (a) anti-CD18 Fab' y F(ab')₂ humanizados;
- (b) anti-CD18 Fab' y F(ab')₂ quiméricos;
- (c) anti-CD18 F(ab')₂ humanizados lineales; y
- 50 (d) anti-p185^{HER2} F(ab')₂ humanizados lineales.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

[0082] **Material celular.** Se usaron cepas de *E. coli* transformadas para producir anti-CD18 Fab' H52, versión OZ (rhuMAb H52OZG1) como se describe en Eigenbrot *et al.*, *Proteins: Structure. Function and Genetics.* **18**:49-62 (1994). Se preparó una versión quimérica de anti-CD 18 MAb, MHM23 (Hildreth *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **13**:202-208 [1983]), se preparó teniendo la secuencia de la cadena ligera SEQ ID No.1 y la secuencia de la cadena pesada SEQ ID No.2. Las

secuencias codificantes del Fab se subclonaron en un vector basado en pAK19 lo cual ha sido previamente descrito por Carter *et al.*, *Bio/Technology* **10**:163-167 (1992). Los fragmentos humanizados lineales anti-CD18 huMAbH52 y anti-p185^{HER2} huAb4D5-8 F(ab')₂ se produjeron como se describe en el Ejemplo 2 abajo.

5 **[0083] Análisis de Cromatografía de Fase Inversa.** La cromatografía de Fase Inversa se llevó a cabo en una columna de fase inversa PLRP-S™ 4,6 x 50mm, tamaño de partícula 8mm, mantenida a 50°C (Polymer Laboratories. Shropshire. UK). Las proteínas se eluyeron utilizando un gradiente lineal creciente desde tampón B 31% a tampón B 41%. El tampón A contenía 0,1% de ácido trifluoroacético en agua desionizada, y el tampón B contenía 0,1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo grado HPLC. Se mantuvo la velocidad de circulación a 2 ml/min, y la longitud de onda para la detección fue de 214 nm.

10 **[0084] Extracción de fragmentos de anticuerpo Fab' a partir de E. coli y protección del sulfidrilo libre con 4,4-DTP.** Se extrajeron fragmentos de anticuerpo de pellets de células congeladas de *E.coli* obtenidos a partir de las fermentaciones de 10 litros. Puesto que las células estaban completamente descompuestas, se añadió 4,4-ditiodipiridina (4,4 DTP) para proteger la cisteína libre en el fragmento de anticuerpo Fab' modificado para que contuviera un tiol libre en la región bisagra (anti-CD18 huMAb H52OZG y anti-CD18 MAb MHM23). Versiones lineales de F(ab')₂ sin las cisteínas libres modificadas en la región bisagra (versiones lineales de anti-CD 18 huMAbH52 y huMAb4D5-8) se extrajeron sin 4,4-DTP, tal y como se describe abajo en el Ejemplo 2.

15 **[0085] Extracción.** Los pellets de células congeladas se resuspendieron a temperatura ambiente en tampón MES 20mM, pH 6,0 conteniendo EDTA 5 mM y 4,4'-DTP 20 mM, previamente disueltos en etanol (3 litros de tampón/kg de gránulos de células). Las células suspendidas se descompusieron pasándolas dos veces por un homogenizador Mantin Gaulin de 5500 a 6500 PSI. El homogeneizado se ajustó a 0,25% (v/v) con polietilenoimina (PEI) y se diluyó en un volumen igual de agua purificada a 2-8°C. A continuación, el homogeneizado diluido se centrifugó. Se encontró el fragmento de anticuerpo en el sobrenadante.

20 **[0086] Purificación de los fragmentos de anticuerpo Fab'-TP protegidos.** Se usó la cromatografía ABX™ para la purificación inicial de los fragmentos de anticuerpo a partir de proteínas de *E.coli*. Para purificar aún más los fragmentos de anticuerpo de las especies de anticuerpos que carecían de una unión disulfuro entre las cadenas ligera y pesada, se introdujo una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo.

25 **[0087] Cromatografía de ABX™.** El sobrenadante que contenía al fragmento de anticuerpo se diluyó con agua purificada a una conductividad de 2 milisiemens o menos. El sobrenadante diluido se bombeó secuencialmente a través de filtros de 0,5 y 0,22 micrones y se cargó en una columna ABX™ (J. T. Baker Phillipsburg, NJ) equilibrado en MES 50mM /EDTA 50mM, a pH 6,0 (Tampón A). El eluyente se siguió a 280 nm. Después de la carga, la columna se lavó con el tampón A por 2 volúmenes de columna. Los anticuerpos se separaron con un gradiente de volumen de 20 columnas de 0 a 50 mM de sulfato de amonio en el tampón A. Se analizaron las fracciones por HPLC y se guardaron apropiadamente.

30 **[0088] Cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo (LPHIC).** Los conjuntos Fab' purificados por ABX™ (anti-CD 18 humanizados y quiméricos) se ajustaron a 20mM de NaPO₄ y el pH de los conjuntos se ajustó a 3,1 utilizando HCl 6N inmediatamente antes de cargarlos en una columna de flujo rápido Fenil Sefarosa™ (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway,NJ). Se prepararon con ABX™ grupos de F(ab')₂ químicamente acoplados (anti-CD18 humanizado y quimérico) y F(ab')₂ lineales (anti-CD18 y anti-p185^{HER2}) de la misma manera excepto que se hicieron en sulfato de amonio 20mM. Se muestra un típico flujo a través del cromatograma de LPHIC en la Fig.1. El pH del anticuerpo purificado por LPHIC se ajustó inmediatamente a pH 5, con NaOH al 10%.

35 **[0089] Análisis de pH.** Se diseñó un experimento para determinar el pH en el que se podría conseguir tanto la máxima purificación como el máximo rendimiento. Se prepararon los conjuntos de ABX™ con NaPO₄ 25mM y se ajustó el pH utilizando HCl 6N. Después de conseguir el pH deseado, se hicieron fluir las muestras a través de la columna de Fenil Sefarosa™ de flujo rápido y los conjuntos se analizaron utilizando HPLC de Fase Inversa para determinar la pureza y el rendimiento.

40 **[0090] Dicroísmo Circular.** El espectro se registró en un instrumento 6ODS modelo AVIV a 25°C. Se usaron cubetas de longitud de recorrido de 1mm se usaron para medidas de UV lejano y cubetas de longitud de recorrido de 10mm para medidas de UV cercano. Se cambiaron de tampón las muestras de anticuerpo purificado rhuMAb H52OZG1 y rhuMAb H52OZG2 en un tampón de KPO₄ 10mM por cromatografía de permeación de gel en Sephadex G25™ (Pharmacia Biotech. Inc. Piscataway, NJ). Las muestras se titularon con ácido fosforito hasta el pH deseado antes de medir el espectro de CD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

45 **[0091] Espectroscopía CD de rhuMAb H52OZG1 y rhuMAb H52OZG2.** El conjunto de ABX™ purificado parece contener pequeñas cantidades de fragmentos de anticuerpo cuyas cadenas ligera y pesada se plegan correctamente pero fallan en la unión covalente a través del enlace disulfuro. Esta impureza se puede detectar en geles SDS y por HPLC analítica de Fase Inversa (Fig.2). Los fragmentos de anticuerpo que no se asociaron covalentemente se pueden separar del producto deseado por desnaturalización preferencial ácida seguida de LPHIC. Para determinar las diferencias de desnaturalización ácida entre las especies unidas a disulfuro y las no asociadas a disulfuro se usaron dos fragmentos de anticuerpo purificados; rhuMAb H52OZG2 y rhuMAb H52OZG1. RhuMAb H52OZG2 es un mutante de

rhuMab H52OZG1 en el cual los residuos de cisteína 215 y 228 en las cadenas ligera y pesada respectivamente han sido cambiados a residuos de serina. Este mutante debería imitar el comportamiento de los anticuerpos no asociados a disulfuro por desnaturalización ácida. Los espectros de UV cercano y de UV lejano de rhuMab H52OZG2 y de rhuMab H52OZG1 a valores diferentes de pH muestran diferentes puntos de transición de la desnaturalización (Figs. 3A-3D). Un punto de transición representa un cambio del fragmento de anticuerpo correctamente plegado, a su estado desplegado. Los fragmentos no asociados a disulfuro se pueden desnaturalizar a aproximadamente pH 3,2, mientras que los fragmentos asociados a disulfuro requirieron valores de pH por debajo de 2,5 para la desnaturalización.

[0092] Análisis del pH por LPHIC. Se puede concluir a partir del análisis de desnaturalización ácida que a aproximadamente un pH 3 los fragmentos no asociados a disulfuro se pueden desnaturalizar y a continuación unirse preferentemente a la columna de Flujo Rápido de Fenil Sefarosa™. Para evaluar el efecto de la variación de pHs bajos en la etapa de LPHIC. Los conjuntos de anticuerpos purificados ABX™ se purificaron por LPHIC a valores diferentes de pH. Se llevaron a cabo análisis de los conjuntos purificados utilizando LPHIC de Fase Inversa. Se generó un diagrama de barras donde la pureza, el rendimiento, y los porcentajes de cadena ligera se determinaron a partir de las purificaciones por LPHIC (Fig.4). A partir del diagrama de barras se determinó que el pH 3,1 era el mejor valor para equilibrar pureza y rendimiento para la purificación de anticuerpo rhuMab H52OZG1. Se realizaron purificaciones a gran escala de conjuntos de ABX™ a pH 3,1.

RESUMEN

[0093] LPHIC hizo posible la purificación de fragmentos de anticuerpo Fab', L-F(ab')₂ y los F(ab')₂ químicamente ligados de especies de anticuerpo no deseados en más del 98% de pureza. El flujo de muestras a través de columna de Flujo Rápido de Fenil Sefarosa™ a pH bajo eliminó anticuerpos que carecen de enlaces disulfuro entre las cadenas ligera y pesada como también especies de cadenas ligeras y pesadas asociadas incorrectamente. Los estudios de Dicroísmo Circular de anticuerpos anti-CD18 F(ab')₂ unidos por disulfuro y no unidos por disulfuro (rhuMab H52OZG1 y rhuMab H52OZG2) demostraron que el anticuerpo (rhuMab H52OZG1) no unido por disulfuro desnaturalizó moléculas de cadenas ligera y pesada a pH 3,2. El anticuerpo (rhuMab H52OZG2) no unido por disulfuro desnaturalizó a pH 2,5. Los experimentos con cromatografía a diferentes valores de pH demostraron que el pH 3,1 representa el mejor valor para equilibrar pureza y rendimiento para la purificación de anti-CD18 rhuMab H52OZG1.

EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO LINEAL

[0094] Este ejemplo describe la producción de fragmentos (L-)F(ab')₂ bivalentes y lineales (que comprenden repeticiones en tándem de un fragmento de cadena pesada, V_H-C_H-V_H-C_H1 cosecretada con una cadena ligera) que se sometieron a LPHIC (ver Ejemplo 1 arriba).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

[0095] Construcción de variantes de L-F(ab')₂. El plásmido de expresión, pAK19, para la secreción del fragmento huMab4D5-8 Fab' se ha descrito previamente (Carter *et al.*, Bio/Technology **10**:163-167 [1992]). Se diseñaron los plásmidos pLA1, pLA2 y pLA3 para secretar variantes L-F(ab')₂, v1, v2 y v3, respectivamente (Fig. 5A). El plásmido pLA1 se construyó a partir de pAK19 modificando la cadena pesada para que codificara los segmentos tándem de Fd huMab4D5- 8: V_H-C_H1-V_H-C_H1. Las v2 y v3 de L-F(ab')₂ se construyeron a partir de pLA1 reemplazando con precisión las copias en 5' o 3' de V_H en pLA1, respectivamente por la del anti-CD18 Ab humanizado, huMab H52OZ (Eingenbrot *et al.*, *supra*). Se diseñó un plásmido para que secretara L-F(ab')₂ anti-CD18. Se construyó un plásmido a partir de anti-CD18 Ab, huMab H52OZ (Eingenbrot *et al.*, *supra*) modificando la cadena pesada para codificar los segmentos tándem de Fd V_H-C_H1-V_H-C_H1.

[0096] Expresión y purificación de variantes de L-F(ab')₂ de E.coli. La producción de huMab4D5-8Fab y de fragmentos F(ab') unidos por tioéter a partir de *E. coli* se ha descrito previamente por Kelley *et al.*, Biochemistry **31**:5434-5441 (1992) y por Rodríguez *et al.*, J. Immunol. **151**:6954-6961(1993). Se secretaron variantes de L-F(ab')₂ a partir de la cepa 33B6 de *E.coli* (Rodríguez *et al.*, Cancer Res. **55**:63-70 [1995]) que contenía los plásmidos correspondientes de expresión crecidos durante 40h a 30°C en un fermentador de 10 litros aireado como se describe previamente (Carter *et al.*, *supra*). Los títulos de expresión se estimaron a partir de ELISA de unión a antígeno (Ag) (Carter *et al.*, *supra*). Las variantes de L-F(ab')₂ se purificaron a partir de 400g de pastas de la fermentación correspondiente descongeladas en presencia de 2 litros de MES 20mM, EDTA 5mM, a pH 6,0 (tampón ME). Las células resuspendidas se descompusieron en tres etapas a través de un "microfluidizer" (Microfluidics Corporation. Newton. MA) y se ajustaron a 0,25% de polietilenoimina (v/v). Se eliminaron los debris sólidos por centrifugación (7.300g. 30 min, 4°C). Se diluyó el sobrenadante en un volumen igual de agua destilada y luego se cargó en una columna Bakerbond ABX™ de 20ml (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) preequilibrada con un tampón ME. L-F(ab')₂ se eluyó utilizando un gradiente lineal de 0-50mM de NH₄SO₄ en tampón ME. El L-F(ab')₂ del conjunto se ajustó a 25mM de Na₂HPO₄, a pH 3,0 y se pasó sobre una columna de Flujo Rápido de Fenil Sefarosa™ de 20 ml (*high sub*) (Pharmacia, Piscataway. NJ) se equilibró con Na₂HPO₄ 25mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, a pH 3,0. El flujo a través de las fracciones que contenían L-F(ab')₂ se agruparon y se ajustaron a pH 6,0.

[0097] Todos los fragmentos de anticuerpo se cambiaron de tampón a PBS por cromatografía de exclusión de tamaño con S 100-HR™ (Pharmacia) (2,5cm x 100cm). Se eliminó la endotoxina residual pasándola repetidamente a través de

filtros PyroBind-ST™ (Sepracor, Marlborough, MA). Se estimó el nivel de endotoxinas en cada preparación con el test del lisado de amebocitos del *Limulus* (Associates of Cape Cod Inc., Woods Hole, MA). Los fragmentos de anticuerpo (Ab) purificados se pasaron a través de un filtro de 0,2mm, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C hasta que se necesitaron.

5 **[0098] Análisis de fragmento Ab unido a p185^{HER2} ECD.** La afinidad y la cinética de la unión de fragmentos huMAb4D5-8 Ab a p185^{HER2} ECD (Fendly *et al.*, *J. Biol. Resp. Mod.* **9**:449-455 [1990]) se determinó por resonancia de plasmón superficial utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia) como previamente han descrito Kelley y O'Connell en *Biochemistry*, **32**:6828-6835 (1993). La estequiometría de unión de los fragmentos Ab a Ag se determinó en solución. Brevemente, se añadieron cantidades variadas de p185^{HER2}ECD (Fendly *et al.*, *supra*) en PBS a una cantidad fija de
10 fragmento Ab (15-20 mg) y la mezcla se analizó, a continuación, mediante FPLC de exclusión de tamaño utilizando una columna de Superosa 12™ (Pharmacia) equilibrada con 0,1M de NaH₂HPO₄, a pH 6,7.

[0099] Ensayo de proliferación celular. El efecto de los fragmentos huMAb4D5-8 Ab (0-30mg/ml) sobre la proliferación de la línea celular de adenocarcinoma humano de pecho BT474, se investigó como se ha descrito previamente (Hudziak *et al.*, *Molec.Cell. Biol.* **9**:1165-1172 (1989)).

15 **[0100] Farmacocinética de los fragmentos de Ab en ratones normales.** Grupos de ratones hembra CD-1 (20-32 g, n = 45) de Halen Sprague Dawley (Indianápolis, IN) recibieron uno de los fragmentos de huMAb4D5 Ab (3-4 mg/ml en PBS) por inyección rápida en la vena de la cola (10 mg/kg). Se sacrificaron tres ratones cada vez a intervalos de tiempo estipulados entre 1 min y 24 h después de la inyección, y se recolectaron y congelaron muestras de su suero. Se
20 determinaron las concentraciones en suero de cada fragmento Ab en el suero mediante ELISA de unión a Ag como se ha descrito previamente utilizando los fragmentos correspondientes como patrones (Rodríguez *et al.*, *supra*). Sólo se detectó F(ab')₂ unido por tioéter (0,7 mg/ml) a las 24 h después de la inyección.

[0101] Se analizaron los datos de cada grupo de tratamiento ajustando una función biexponencial, $C(t) = Ae^{-at} + Be^{-bt}$, a los valores medios de las concentraciones de suero en cada intervalo de tiempo. Se estimaron componentes exponenciales por un método no lineal de mínimos cuadrados utilizando el procedimiento de Gauss-Newton-Marquardt-Levenberg (Press *et al.*, in *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, UK; [1988]) y una ponderancia de y^2 ,
25 donde y es la concentración de suero medida. El volumen de distribución inicial (V_1), volumen de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}), tiempo de eliminación (CL), más las vidas medias inicial y final ($t_{1/2}$) se calcularon entonces a partir de parámetros estimados como se describen en (Wagner, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **4**:443-467 [1976]):

$$C_0 = A + B$$

30 $V_1 = \text{Dosis} / C_0$

$$V_{ss} = (A / a^2 + B / b^2) / (\text{AUC})^2$$

$$\text{CL} = \text{Dosis} / \text{AUC}$$

$$T_{1/2} \text{ inicial} = \ln 2 / a$$

$$T_{1/2} \text{ final} = \ln 2 / b$$

35 donde C_0 es la concentración inicial extrapolada, y AUC es el área bajo la concentración ajustada de plasma *versus* la curva de tiempo. Se estimó el tiempo de permanencia (T), que es el intervalo de tiempo estimado utilizado por el medicamento en todas sus etapas a través de un compartimiento (en este caso, suero) se estimó (Mordenti y Rescigno, *Pharm. Res.*, **9**:17-25 [1992]) como sigue: $T = \text{AUC} / C_0$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

40 **[0102] Diseño de L-F(ab')₂.** Variantes de L-F(ab')₂ se diseñaron para que comprendieran una cadena pesada (H) de fragmentos Fd en tándem, V_H-C_H1-V_H-C_H1, asociada a dos copias de la correspondiente cadena ligera (L) (Fig.5A). En el cruce Fd-Fd, el C terminal de C_H1 (... THT) se une directamente a N-terminal de V_H(EVQ...) sin ninguna secuencia extraña unida a proteína. Esto fue un intento para minimizar los riesgos potenciales de inmunogenicidad y de susceptibilidad a proteasas de suero en pacientes. Un inconveniente potencial de esta estrategia de omitir uniones es
45 que la accesibilidad del sitio de unión del C-terminal al antígeno (Ag) podría ser perjudicial.

[0103] La variante de huMAb4D5-8 L-F(ab')₂, v1, se diseñó para que tuviera dos sitios funcionales de unión para el Ag, p185^{HER2}ECD (Fig.5A). En contraste, v2 y v3 de huMAb4D5-8 L-F(ab')₂ se diseñaron para que tuvieran un solo sitio de unión a Ag. Esto se llevó a cabo reemplazando las copias 5' o 3' de V_H en la v1 de L-F(ab')₂ por aquellas del anti-CD 18 Ab, huMAbH52OG (Eigenbrot *et al.*, *supra*). Un Fab que comprende la cadena L de huMAb4D5-8 y la cadena H del
50 fragmento Fd de huMAbH52OZ se expresó y se purificó y se encontró que no se unía a p185^{HER2} ECD como se preveía.

[0104] Producción y caracterización *in vitro* de fragmentos (Ab) de anticuerpo. Las variantes L-F(ab')₂ se expresaron en *E. coli* por cosecreción de la cadena L con fragmentos Fd de la cadena H en tándem de un operón dicistrónico (Fig. 5B). Se consiguieron títulos de $\geq 100\text{mg/l}$ de L-F(ab')₂ de huMAb4D5-8 (Ag-unión) funcional se consiguieron siguiendo el cultivo de *E. coli* que contenía plásmidos de expresión correspondientes a una densidad
55 celular alta en el fermentador. L-F(ab')₂ se recuperó directamente a partir de *E. coli* mediante pastas de fermentación

correspondientes a la descomposición completa seguido de ABX™, interacción hidrofóbica a pH bajo, y cromatografía de exclusión de tamaño. La concentración de endotoxina se estimó como $\leq 0,32$ unidades de endotoxina por mg de proteína purificada.

5 [0105] Las variantes de huMAb4D5-8 L-F(ab')₂ purificadas junto con F(ab')₂ y Fab se analizaron mediante SDS-PAGE. Bajo condiciones de no reducción las tres variantes de huMAb4D5-8 L-F(ab')₂ (M_r ~96 kDa) y el fragmento Fab (M_r ~48 kDa) muestran una banda principal con la movilidad electroforética esperada. El fragmento de F(ab')₂ unido por tioéter (M_r ~96kDa) muestra una movilidad anómalamente retrasada comparada con el patrón de 97 kDa.

10 [0106] Bajo condiciones de no reducción todos los fragmentos huMAb4D5-8 Ab generan una banda de de peso molecular aparente de ~23 kDa para la cadena L libre. Además, L-F(ab')₂ y F(ab')₂ generan una banda de ~48 kDa como se esperaba por la presencia del tándem y dímeros de la cadena H unidos por tioéter, respectivamente. Las cadenas H y L reducidas para el fragmento Fab no se distinguieron bajo las condiciones electroforéticas utilizadas.

15 [0107] Los análisis de la unión de los fragmentos Ab a p185^{HER2} ECD. La estequiometría de la interacción Ab-Ag se investigó por titración de los fragmentos huMAb4D5-8 Ab con p185^{HER2} ECD seguido de un análisis cromatográfico de exclusión por tamaño (Figs. 6A-6C). V1 de huMAb4D5-8 L-F(ab')₂ y F8ab')₂ muestran perfiles de titración muy similares con p185^{HER2} ECD y unen dos equivalentes de antígeno (Figs. 6A y 6B). Como se esperaba, el fragmento Fab se une a un equivalente de Ag (Fig. 6C). V2 y v3 de F(ab')₂ se unen únicamente a un sólo equivalente de Ag.

[0108] La afinidad y cinética de unión de los fragmentos huMAb4D5-8 Ab al Ag se investigaron por resonancia de plasmón superficial utilizando p185^{HER2}ECD inmovilizado. Ver abajo tabla 1.

Tabla 1

Análisis de unión de fragmentos anti-p185^{HER2} a p185HER2ECD^a

Fragmento Ab	$k_{on}^b \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$	$k_{off}^b \text{ s}^{-1}$	$K_d \text{ nM}$
Fab	3.4×10^5	5.2×10^{-4}	1.5
L-F(ab') ₂ v1	6.4×10^5	2.9×10^{-4}	0.46
L-F(ab') ₂ v2	2.3×10^5	2.8×10^{-4}	1.2
L-F(ab') ₂ v3	5.7×10^5	3.1×10^{-5}	5.5
F(ab') ₂	1.9×10^6	3.2×10^{-4}	0.17

^aDatos obtenidos por resonancia de plasmón superficial
^bSE de estimados $\pm 3\%$

25 [0109] La variante bivalente L-F(ab')₂, v1, se une a Ag con una afinidad 3 veces inferior a la que tiene F(ab')₂. Esto refleja principalmente una pequeña disminución en la tasa de unión entre F(ab')₂ y L-F(ab')₂, respectivamente. Las variantes monovalentes de L-F(ab')₂ v2 y v3 muestran aproximadamente uniones a 3 veces y 12 veces mas débiles que la variante bivalente de L-F(ab')₂, v1. De este modo ambos sitios de unión en el L-F(ab')₂ son competentes para la unión a p185^{HER2}ECD, aunque la eficiencia de la unión a Ag aparentemente se ve ligeramente afectada por el sitio C-terminal. Como se esperaba, la afinidad de unión de L-F(ab')₂ v2 es muy similar a la correspondiente del fragmento Fab.

40 [0110] **Actividad antiproliferativa de fragmentos Ab.** Se investigó la actividad antiproliferativa de fragmentos huMA4D5-8 Ab usando la línea celular de tumor de pecho, BT474, que sobreexpresa p185^{HER2} (ver Fig. 7). La proliferación de BT474 en presencia de cantidades saturadas de L-F(ab')₂ v1 y F(ab')₂ unido por tioéter son del 40% y del 55% del control no tratado, respectivamente. De esta manera L-F(ab')₂ v1 es más potente en el bloqueo de la proliferación de células BT474 de lo que es el fragmento F(ab')₂ unido a tioéter. Las actividades antiproliferativas de las variantes monovalentes L-F(ab')₂, v2 y v3, se acercan a la de la variante bivalente L-F(ab')₂, v1, y son mucho mayores que la del fragmento de Fab.

45 [0111] Caracterización farmacocinética de fragmentos Ab en ratones normales. Se determinó el transcurso de las variantes de huMAb4D5-8 Fab, F(ab')₂ y L-F(ab')₂ en el suero de ratones normales a partir del sacrificio en serie de múltiples animales (Fig. 8) y se utilizaron para calcular los parámetros farmacocinéticos. Ver Tabla 2 abajo

Tabla 2

Parámetros farmacocinéticos para fragmentos anti-p185HER2 en ratones normales ^a						
Fragmento Ab	V ₁ ml kg ⁻¹	V _{ss} ml kg ⁻¹	CL h ⁻¹ kg ⁻¹	t _{1/2} horas		T horas
				inicial	terminal ^b	
L-F(ab') ₂ v1	29.0	38.0	19.3	0.40	1.6	1.50
F(ab') ₂	36.1	44.0	20.6	0.99	2.6	1.75
Fab	22.6	35.4	106	0.14 4	1.6	0.21

^a Parámetros farmacocinéticos calculados a partir de los datos de la Figura 3
^b La vida media terminal contribuye un 83%, 30% y 6,5% al AUC total para v1 de L-F(ab')₂, F(ab')₂ y Fab, respectivamente

5

10

15

[0112] L-F(ab')₂ y F(ab')₂ unidos por tioéter son muy similares en cuanto a sus parámetros farmacocinéticos, mientras que el fragmento Fab es claramente mas rápido. Los tiempos de permanencia en suero para L-F(ab')₂ v1 y fragmentos F(ab')₂ unidos a tioéter, son 7 veces y 8 veces superiores al fragmento Fab, respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0113]

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.

20

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DIRECCIÓN: Genentech, Inc.

(B) CALLE: 460 Point San Bruno Blvd.

25

(C) CIUDAD: South San Francisco

(D) ESTADO: California

(E) PAIS: USA

(F) CP: 94080

(v) FORMA DE LECTURA PARA ODENADOR

30

(A) TIPO DE MEDIO: 3,5 pulgadas, 1,44 Mb de almacenamiento

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: WinPatin (Genentech)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

35

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20-Abril-1995

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE

(A) NOMBRE: Lee, Wendy M.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 00.000

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXTRACTO: P0941PCT

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: 415/225-1994

5

(B) TELEFAX: 415/952-9881

(C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 214 amino ácidos

10

(B) TIPO: Amino Ácido

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC. ID NO: 1:

					185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	
				200					205						210
Arg	Gly	Glu	Cys												
			214												

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 232 amino ácidos

(B) TIPO: Amino Ácido

10

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

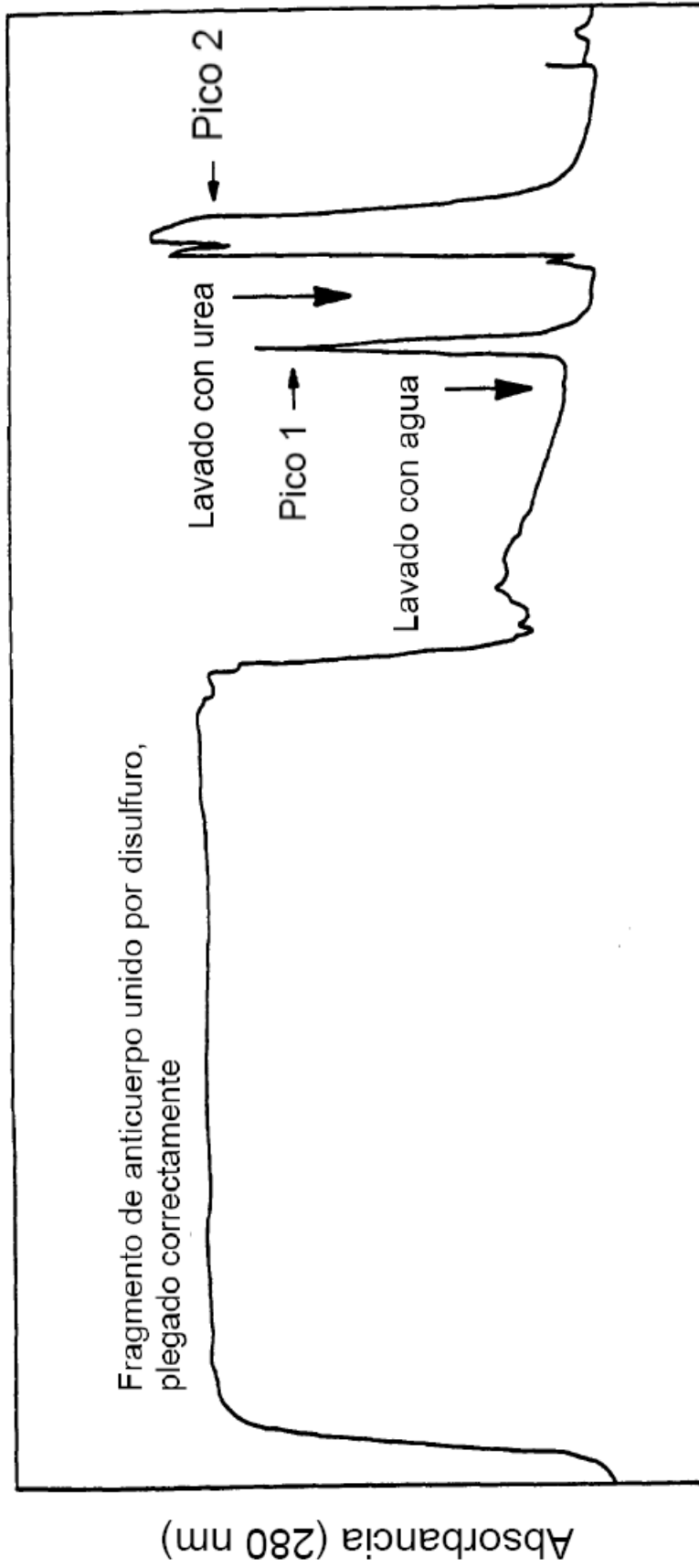
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:2:

	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
5	1				5					10					15
	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
					20					25					30
10	Glu	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
					35					40					45
	Glu	Trp	Ile	Gly	Gly	Phe	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	His
					50					55					60
15	Asn	Gln	Arg	Phe	Met	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Asp	Lys	Ser
					65					70					75
	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
					80					85					90
20	Ser	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Arg	Gly	Leu	Asn	Tyr	Gly
					95					100					105
	Phe	Asp	Val	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val
25					110					115					120
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
					125					130					135

	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
					140					145					150
5	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
					155					160					165
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
10					170					175					180
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
					185					190					195
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
15					200					205					210
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
					215					220					225
20	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr								
					230		232								

REIVINDICACIONES

- 5
1. Anticuerpo que comprende un fragmento de cadena pesada $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ lineal asociado con dos fragmentos de cadena ligera, donde el extremo C-terminal de C_{H1} está unido directamente, sin ninguna secuencia de proteína de unión externa, al extremo N-terminal de V_H en la unión Fd-Fd del fragmento de la cadena pesada.
 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, donde los dominios V_H son idénticos.
 3. Ácido nucleico aislado que codifica por un fragmento de cadena pesada $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
 - 10 4. Método para preparar el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende cultivar una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica el fragmento de la cadena pesada y un fragmento de cadena ligera de tal forma que el ácido nucleico se exprese; y recuperar el fragmento de anticuerpo del cultivo de células huésped.



Volumen de elución

FIG.1

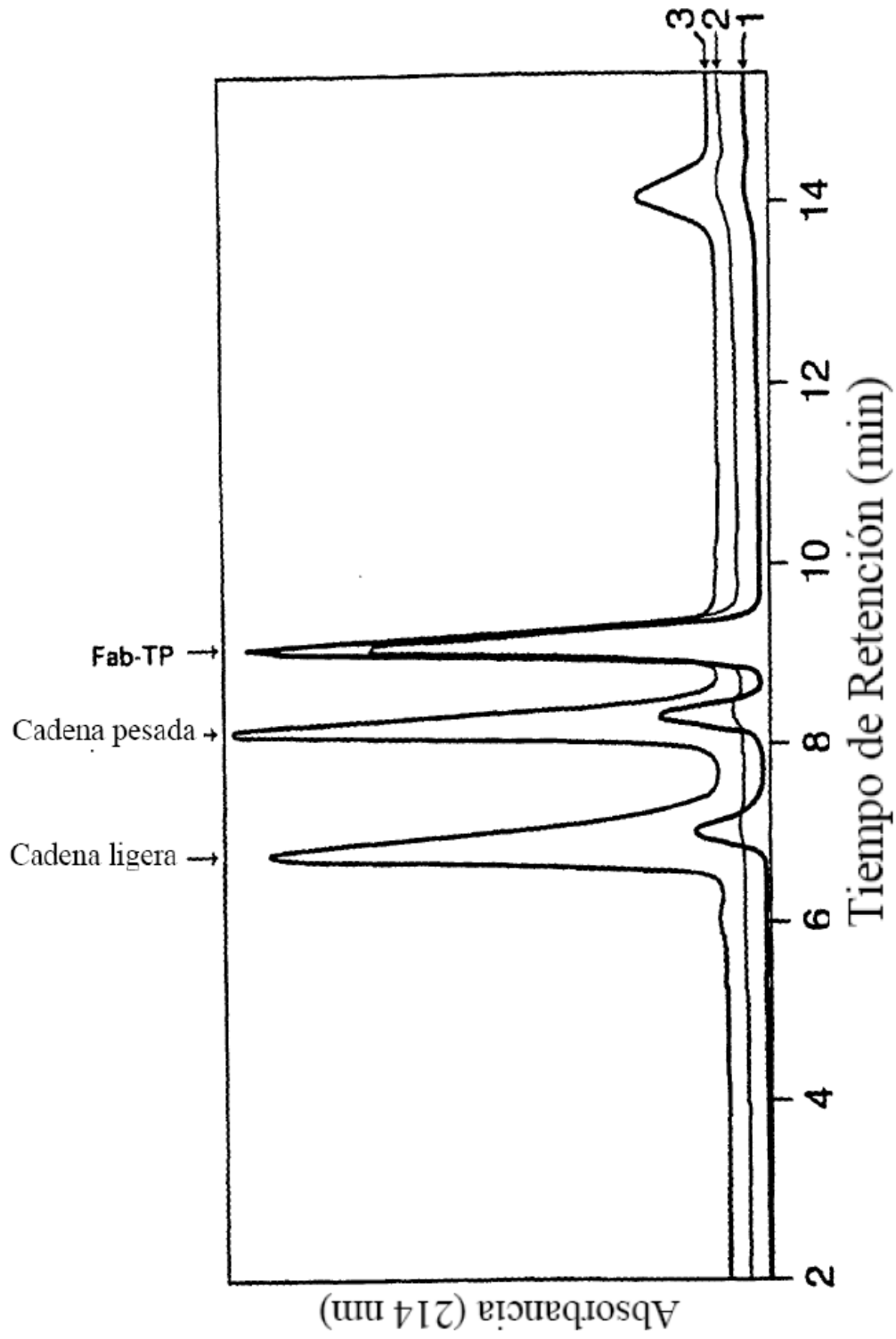


FIG.2

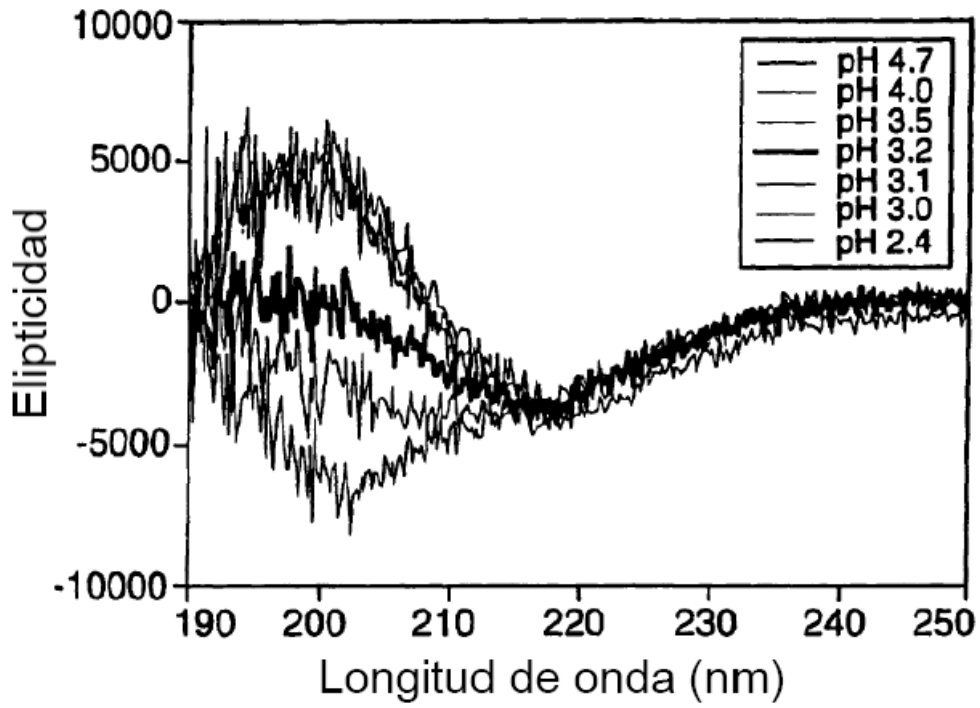


FIG.3A

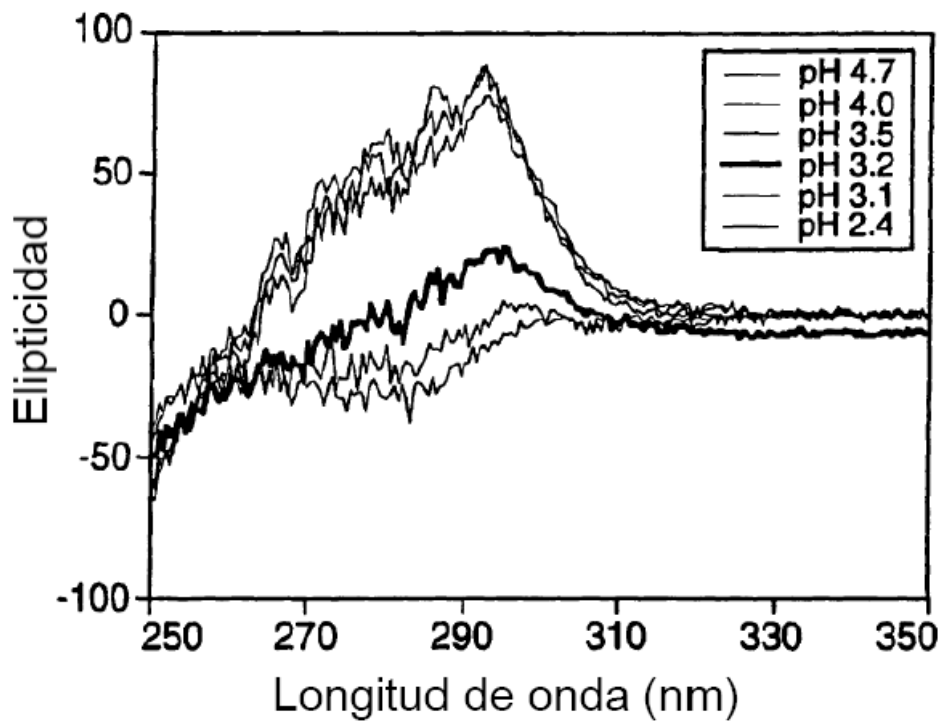


FIG.3B

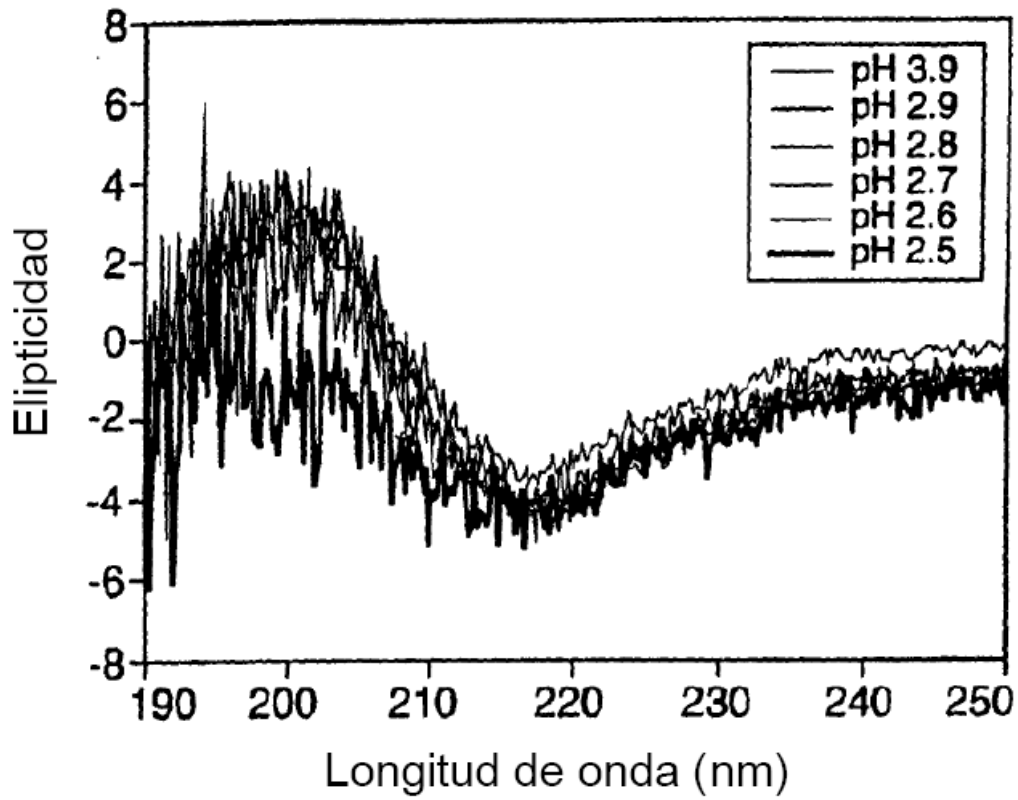


FIG.3C

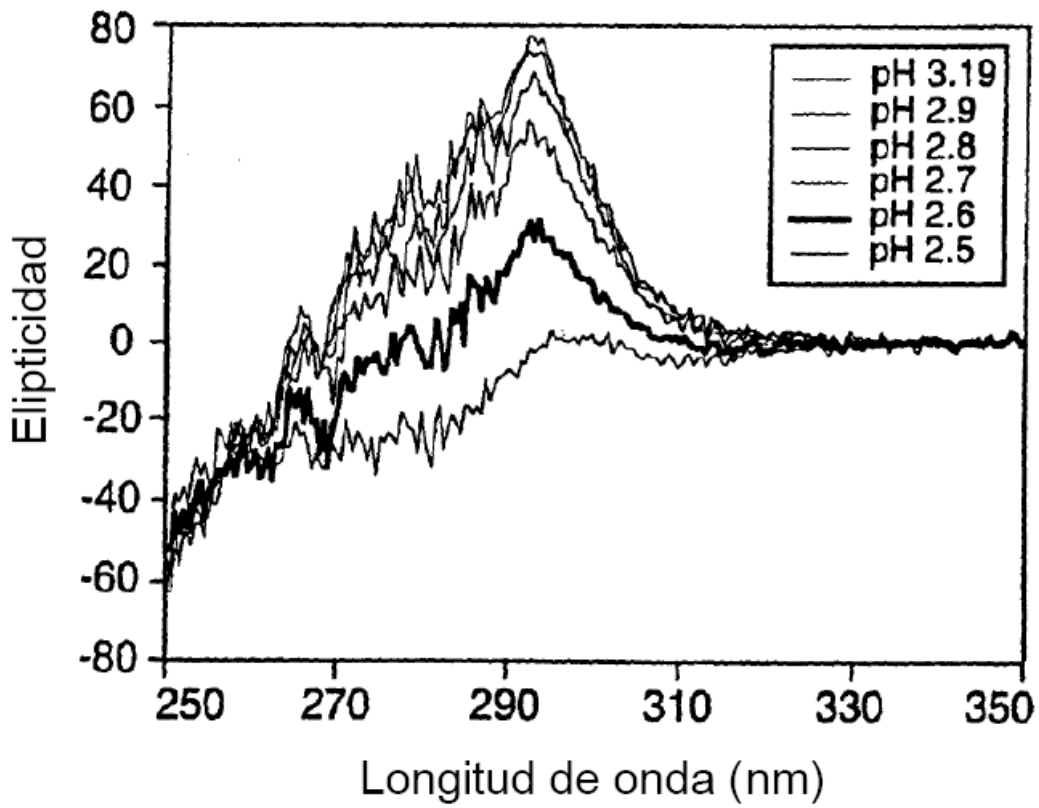


FIG.3D

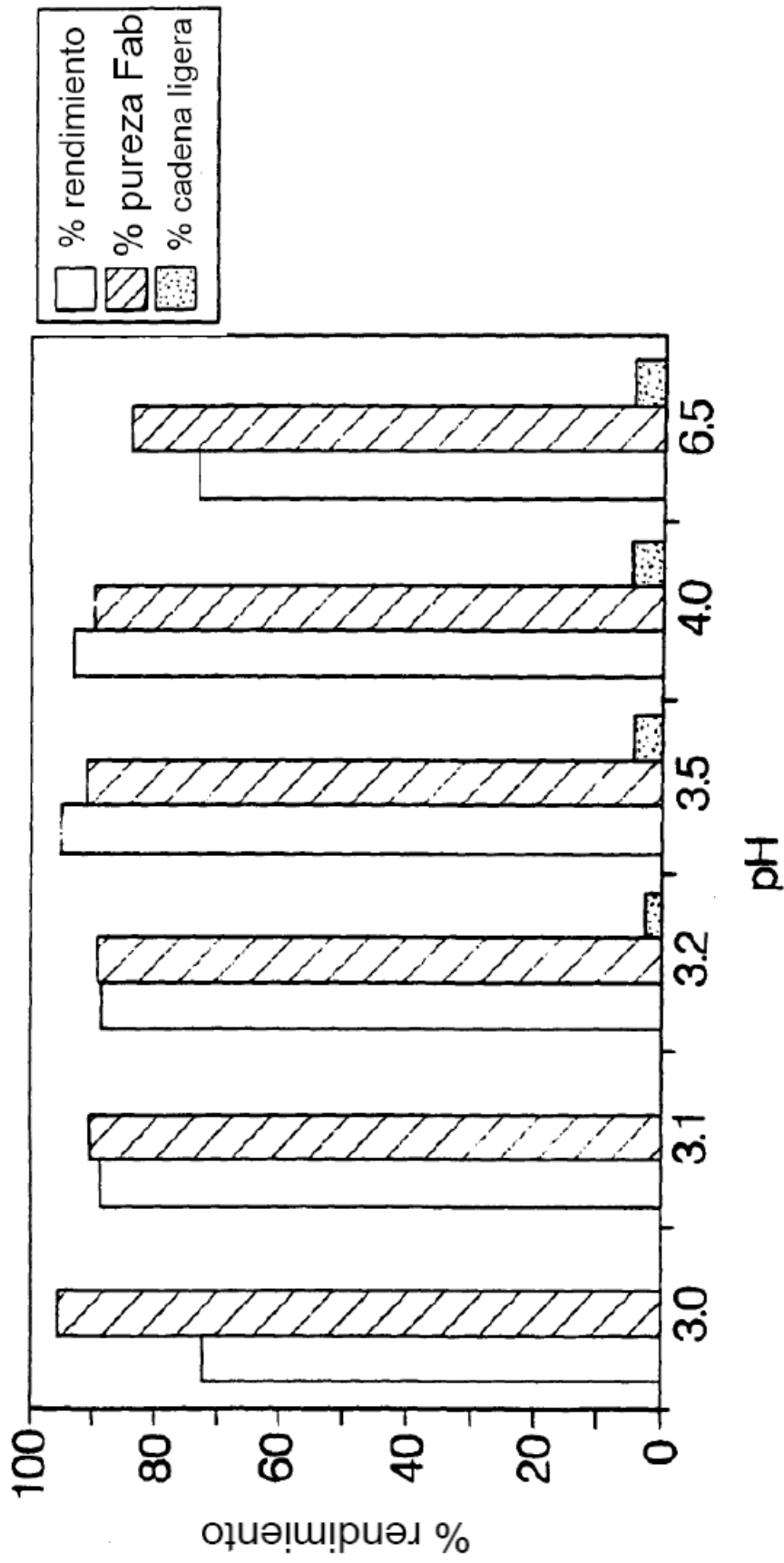


FIG.4

FIG.5A

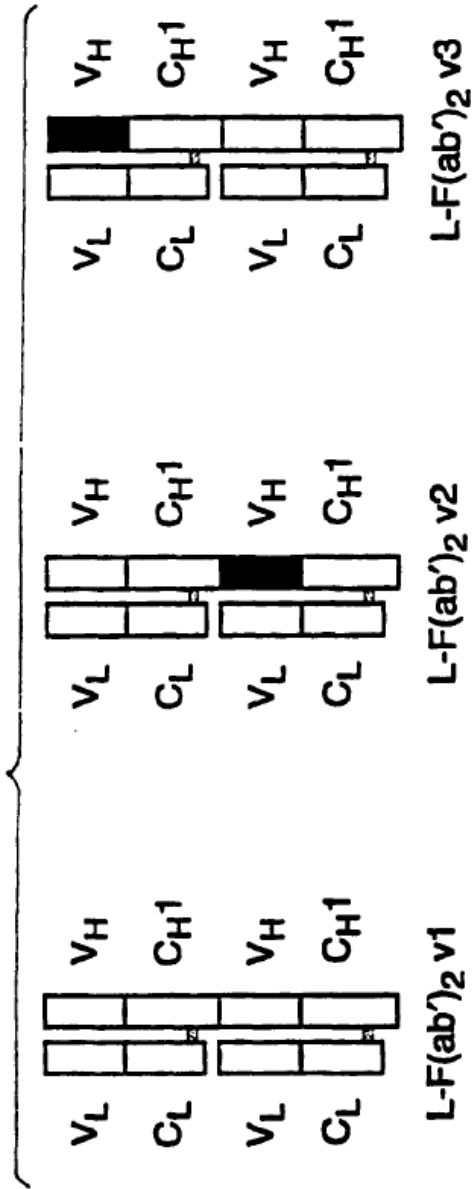
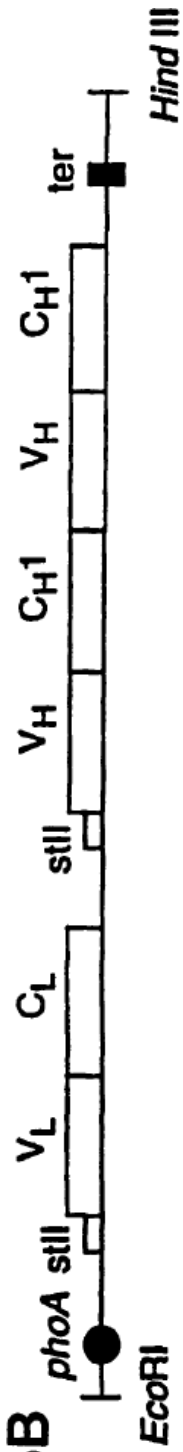
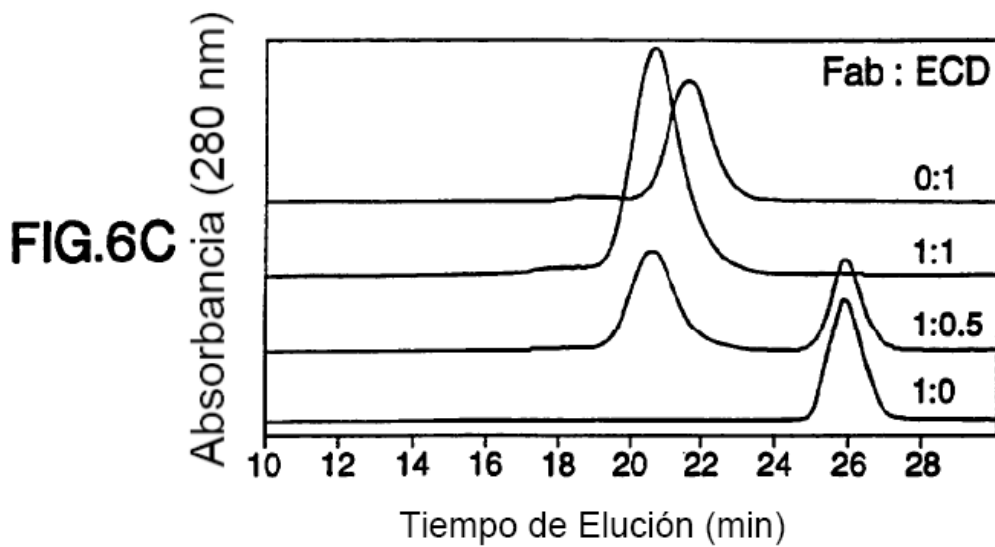
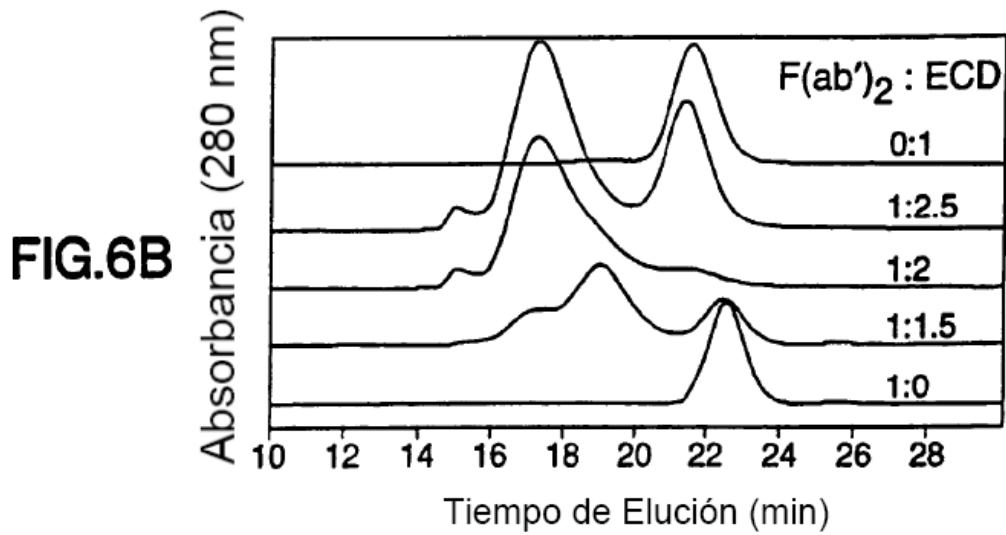
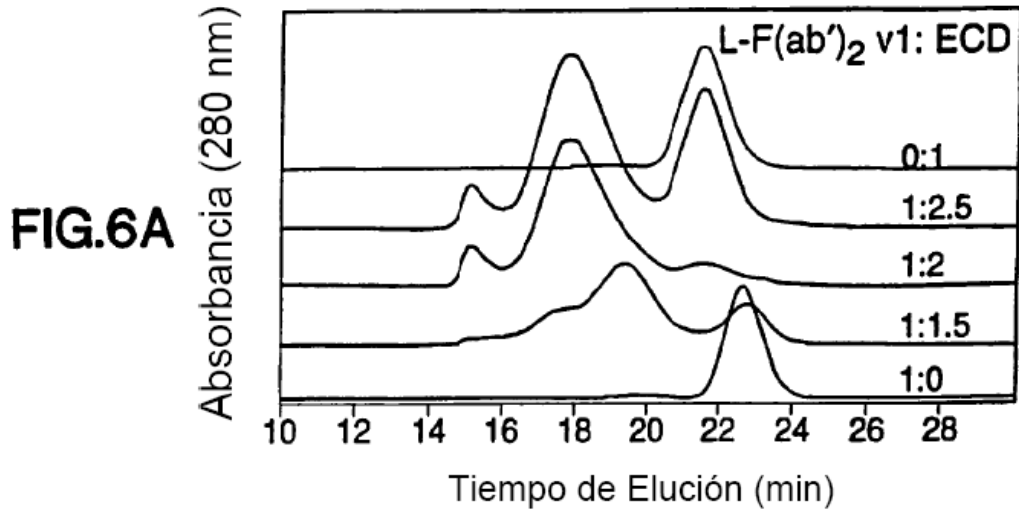


FIG.5B





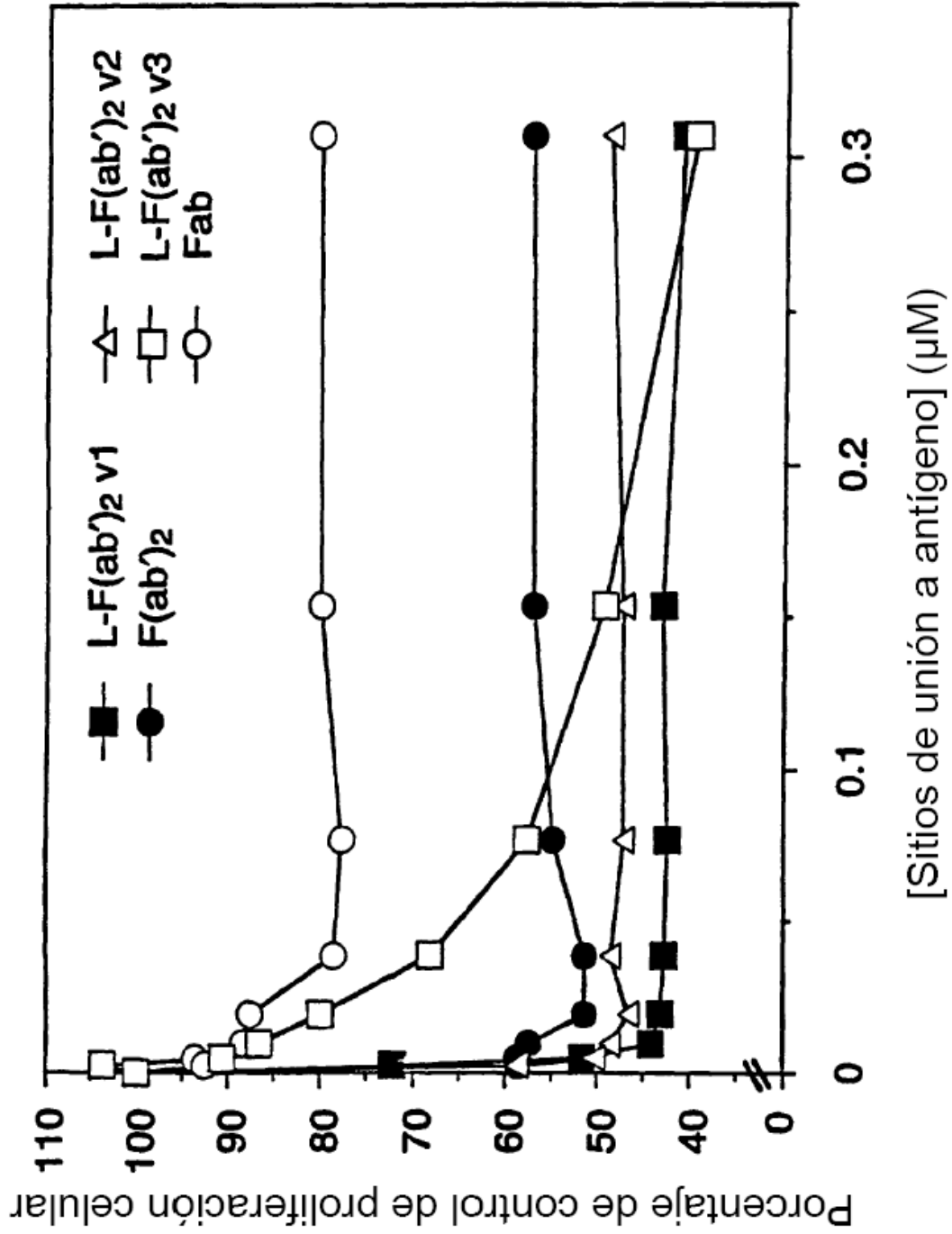


FIG.7

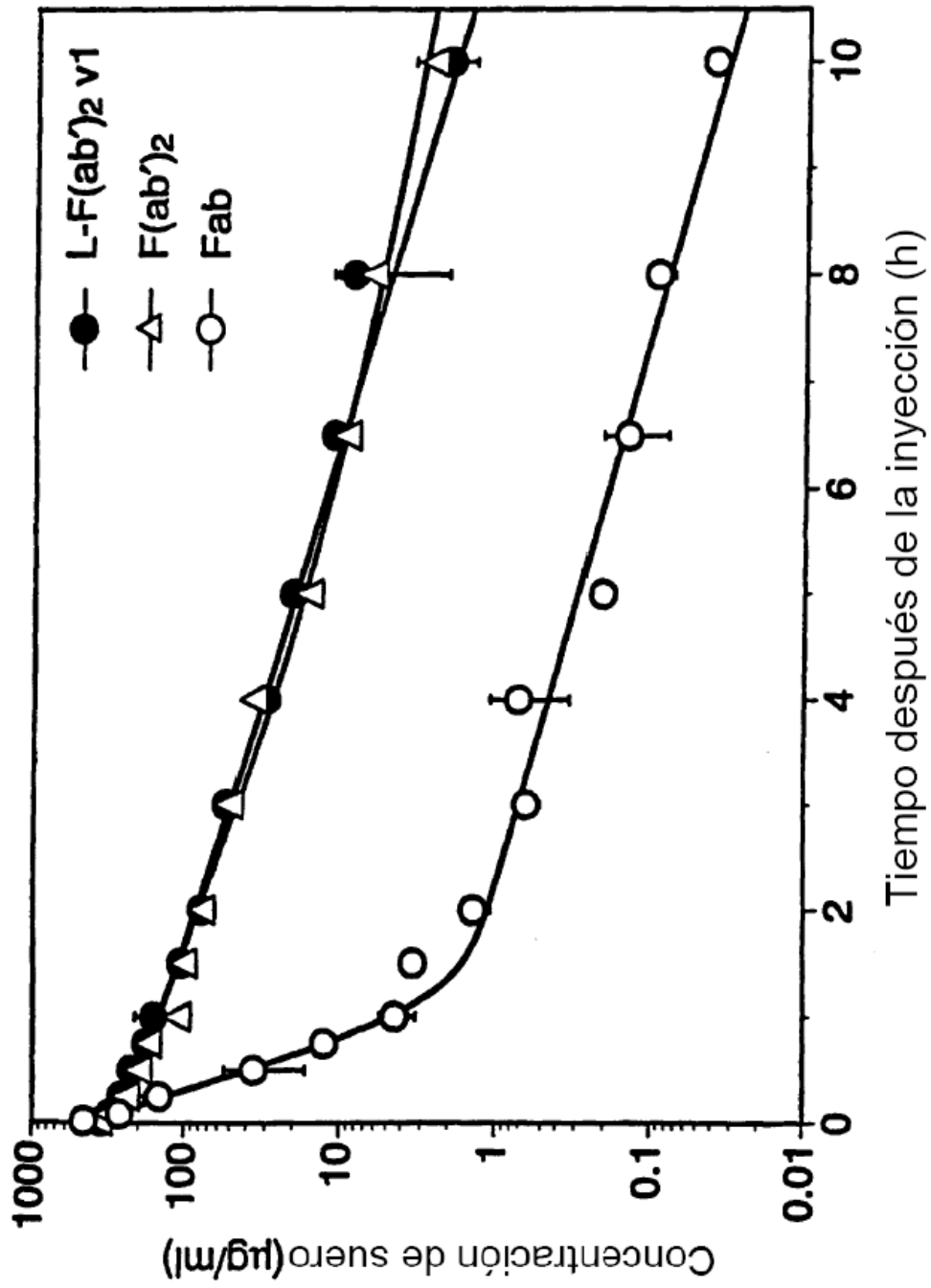


FIG.8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

10 Documentos de patentes citados en la descripción

- U.S. 4,816,567.
- EP 404,097.
- WO 93/11161.
- 15 • WO 93/08829
- US 4.4676.980
- WO 91/00360
- WO 92/200373
- EP 03089.
- 20 • US 4.376.110.
- US 3.773.919.
- EP 58.481
- EP 133.988
- DE 3.218.121.
- 25 • EP 52.322.
- EP 36.676.
- EP 88.046.
- EP 143.949.
- EP 142.641.
- 30 • solicitud de patente japonesa 83-118008.
- US 4.485.045.
- US 4.544.545.
- EP 102.324.
- EP 0517024.

35

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- Protein Purification 2d Ed., Springer-Verlag. New York, pgs. 176-179(1988).
- Mallender et al., The Journal of Biological Chemistry, vol 269 no. 1: 199-206 (1994).

- Danielsson *et al.*, Journal of Immunological Methods **115**:79-88 (1988).
- Bridonneau *et al.*, Journal of Chromatography **616**: 197-204 (1993).
- Berkovich *et al.*, Journal of Chromatography **389**:317-321 (1987).
- 5 • Gagnon *et al.*(90th Annual Meeting, American Society for Microbiology, Anaheim, May 13-17, 1990) Abstract No. 0-4 Johansson *et al.* Biol. Recombinant Microorg. Anim. Cells, (Oholo 34 Meeting), 409-414 (1991).
- Pavlu *et al.*, Journal of Chromatography **359**:449-460 (1986).
- Abe *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods **27**:215-227(1993).
- Inouye *et al.*, Protein Engineering pgs. 6, 8 y 1018-1019 (1993).
- 10 • Inouye *et al.*, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects **5**:609-616(1993).
- Inouye *et al.*,Journal of Biochemical and Biophysical Methods **26**:27-39 (1993).
- Marimoto *et al.*,Journal of Biochemical and Biophysical Methods **24**:107-117 (1992).
- Rea *et al.*, Journal of Cell, Biochem.Suppl. 0, Abstract No. X1-206 (17 Part A), p.50 (1993).
- Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975).
- 15 • Clackson *et al.*, Nature. 352:624-628 (1991).
- Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).
- Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 [1984].
- Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986).
- Richmann *et al.*, Nature. 332:323-329 (1988).
- 20 • Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).
- Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 [Academia Press 1986]
- Kozbor, J. Immunol., 133:3001 [1984].
- 25 • Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 [Marcel Dekker, Inc., New Cork, 1987].
- Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).
- Skerra *et al.*, Curr, Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993).
- Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992).
- McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990)
- 30 • Clackson *et al.*, Nature. 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597
- Mark *et al.*,Bio/Technology, 10:779-783 [1992]
- Waterhouse *et al.*, Nuc.Acids. Res., 21:2265-2266[1993]).
- Hunter *et al.*, Nature, 144:945 (1962).
- David *et al.*, Biochemistry. 13:1014 (1974).
- 35 • Pain *et al.*, J Immunol. Meth., 40:219 (1981).
- Nygren, J.Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).
- Verhoeyen *et al.*, Science,239:1534-1536 [1988].
- Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 [1993].
- Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901 [1987]

- Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 [1992].
- Presta et al., J. Immunol., 151:2523 [1993]
- Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-255 (1993)
- Jacobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)
- 5 • Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33(1993).
- Hoogenboom y Winter, J.Mol.Biol., 227:381 [1991].
- Brennan el al., Science, 229:81 [1985]).
- Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 [1992].
- Millstein y Cuello, Nature, 305:537-539 [1983].
- 10 • Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).
- Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).
- Shalaby et al.,J.Exp.Med., 175:217-225 (1992)
- Rodríguez et al., Int. J. Cancers, (Suppl.) 7:45-50 (1992).
- Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)
- 15 • Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90:6444-6448 (1993)
- Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).
- Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 [1983]
- Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 [1986].
- Goldenberg et al., Semin. Cancer Biol. 1(3): 217-225 (1990)
- 20 • Beck et al., Semin. Cancer Biol. 1(3):181-188 (1990).
- Niman, Immunol.Ser. 53:189-204 (1990).
- Endo, Nippon Igatu Hoshasen Gakkai Zasshi (Japan) 50(8):901-909 (1990).
- Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th edition, Osol, A., Ed., [1980]]
- 25 • Langer et al., J.Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981).
- Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)
- Sidman et al., Biopolymers 22:547-556[1983])
- Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985)
- Hwang et al., Proc. Natl.Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980)
- 30 • Eigenbrot et al., Proteins: Structure. Function and Genetics. 18:49-62 (1994)
- Hildreth et al., Eur. J. Immunol. 13:202-208 [1983]
- Kelley et al., Biochemistry 31:5434-5441 (1992)
- Rodríguez et al., J. Immunol. 151:6954-6961(1993)
- Rodríguez et al., Cancer Res. 55:63-70 [1995]
- 35 • Fendly et al., J. Biol, Resp. Mod. 9:449-455 [1990]
- Kelley y O'Connell Biochemistry, 32:6828-6835 (1993)
- Hudziak et al., Molec.Cell. Biol. 9:1165-1172 (1989).
- Press et al., in Numerical Recipies in C, Cambridge University Press, UK; [1988]

- Wagner, J. Pharmacokin. Biopharm. 4:443-467 [1976]
- Mordenti y Rescigno, Pharm. Res., 9:17-25 [1992]