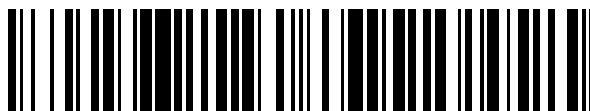


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 330**

51 Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08705841 .8**
96 Fecha de presentación: **10.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2120915**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **PRECIPITACIÓN CON POLIELECTROLITO Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.**

30 Prioridad:
22.01.2007 US 886068 P
13.12.2007 US 13446

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.02.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
FAHRNER, Robert, L.;
FRANKLIN, Jayme;
MCDONALD, Paul, J.;
PERAM, Thanmaya;
SISODIYA, Vikram y
VICTA, Corazon

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 374 330 T3

DESCRIPCIÓN

Precipitación con polielectrolito y purificación de anticuerpos

5 **[0001]** CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a métodos para purificar proteínas.

10 **[0003]** ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] La purificación económica a gran escala de proteínas es un importante problema creciente para la industria de la biotecnología. En general, las proteínas se producen mediante el cultivo celular utilizando líneas celulares de mamífero o bacterianas diseñadas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, normalmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células hasta una pureza suficiente para su uso como producto terapéutico humano plantea un tremendo desafío.

[0005] Las proteínas terapéuticas recombinantes se producen normalmente en varias líneas celulares de huésped mamífero que incluyen mieloma murino NS0 y células de ovario de hámster chino (CHO) (Anderson, D.C y Krummen, L. (2002) Curr. Opin. Biotech. 13: 117-123; Chu, L. y Robinson, D.K. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:180-187). Cada línea celular presenta ventajas y desventajas en términos de productividad y las características de las proteínas producidas por las células. La elección de las líneas celulares de producción comercial sopesan a menudo la necesidad de una mayor productividad con la capacidad de proporcionar atributos de calidad del producto requeridas para un producto determinado. Una clase importante de proteínas recombinantes terapéuticas que a menudo requieren procesos de titulación elevada son los anticuerpos monoclonales. Algunos anticuerpos monoclonales necesitan funciones efectoras, mediadas a través de la región de Fc, para producir sus funciones biológicas. Un ejemplo es rituximab (RITUXAN®, Genentech, Inc. y Biogen-Idec), un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a CD-20 de la superficie celular en el agotamiento de células B (Cartron et al (2002) Blood 99: 754-758; Idusogie et al (2000) J. Immunol. 164: 4178-4184). Otros anticuerpos, tales como bevacizumab (AVASTIN™, Genentech, Inc.), un anticuerpo anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) humanizado, no requieren de las funciones efectoras de Fc para su actividad.

[0006] Los avances en las técnicas de fermentación y cultivo celular han aumentado ampliamente los títulos de proteínas diana en el fluido de cultivos. Este incremento en la eficacia cascada arriba ha llevado a un cuello de botella en el procesamiento cascada abajo en la etapa de recogida celular. La recogida celular o la purificación del fluido del cultivo celular recogido es un proceso importante en casi todas las purificaciones cascada debajo de los productos de base biotecnológica. Cuando el producto es interno a las células, la recogida celular se utiliza para disminuir el volumen líquido de las células a procesar en las etapas de extracción de producto. Cuando el producto es extracelular, se utiliza la recogida celular para separar el producto de las células y el residuo celular, por ejemplo, el aislamiento de un anticuerpo extracelular del cultivo celular de mamífero (Anthony S. Lubiniecki, Ed. (1990) Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology, Marcel Dekker; Hansjoerg Hauser, Roland Wagner, Eds. (1997) Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production, Walter Gruyter Publishing).

[0007] Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir del residuo celular dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Se puede provocar que algunas proteínas se secreten directamente desde la célula al medio de crecimiento circundante; otras se producen intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa del proceso de purificación implica la lisis de la célula, que se puede realizar mediante varios métodos, incluyendo el corte mecánico, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha alteración libera el contenido completo de la célula en el homogenato y además, produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su tamaño pequeño. Éstos se eliminan en general mediante centrifugación diferencial o mediante filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y la liberación de proteínas intracelulares de la célula huésped en el transcurso del desarrollo de producción de proteínas.

[0008] Durante la purificación de anticuerpos terapéuticos, se deben eliminar impurezas que incluyen proteínas de las células huésped, variantes de productos, ADN de las células huésped, moléculas pequeñas, contaminantes relacionados con el proceso, endotoxinas y partículas virales (Fahrner, R.L. et al (2001) Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 18:301-327). Las técnicas de purificación utilizadas deben ser escalables, eficientes, rentables, fiables y que cumplan los requisitos de pureza rigurosos del producto final. Las técnicas de purificación actuales implican habitualmente múltiples separaciones cromatográficas que utilizan modos de separación ortogonales. Un proceso habitual podría incluir algunas de las siguientes etapas: precipitación (US 7169908), diálisis, electroforesis, ultrafiltración, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de interacción hidrofóbica. Las etapas de cromatografía en columna convencionales son

eficaces y fiables, pero en general tiene un rendimiento de producto bajo (kg procesado/h). Dado que los anticuerpos monoclonales son cada vez más utilizados, es necesaria una producción a escala de proceso más eficiente.

[0009] Las técnicas de cromatografía explotan las propiedades químicas y físicas de las proteínas para conseguir un grado elevado de purificación. Estas propiedades químicas y físicas incluyen habitualmente el tamaño, punto isoeléctrico, distribución de carga, sitios hidrofóbicos y afinidad por ligandos (Janson, J.C. y L. Ryden (eds.). (1989) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, Inc., New York). Los diversos modos de separación de cromatografía incluyen: cromatografía de intercambio iónico, "chromatofocusing", filtración en gel (exclusión por tamaño), interacción hidrofóbica, fase inversa, y afinidad. La cromatografía de intercambio iónico (IEX), incluyendo cromatografía de intercambio aniónico e intercambio catiónico separa los analitos (por ejemplo, proteínas) por las diferencias de sus cargas netas en superficie. IEX es una herramienta principal para la separación de proteínas expresadas de los residuos celulares y otras impurezas. Actualmente, la IEX es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para la purificación de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas, ofreciendo una resolución elevada y separaciones de grupos con una capacidad de recarga elevada. La técnica es capaz de separar especies moleculares que presentan diferencias pequeñas en sus propiedades de carga, por ejemplo, dos proteínas que difieren en un aminoácido cargado. Estas características hacen que IEX sea adecuado para etapas de captura, purificación de intermedio o refinamiento en un protocolo de purificación y la técnica se utiliza desde purificación y análisis a microescala a purificación de kilogramos de producto.

[0010] Las técnicas de cromatografía son fiables, pero la capacidad y el rendimiento pueden ser problemáticos para aplicaciones a gran escala. Las etapas de cromatografía en columna convencionales son efectivas y fiables, pero en general el rendimiento de producto es bajo (kg procesado/h). Dado que las proteínas recombinantes son cada vez más utilizadas, es necesaria una producción a escala de proceso más eficiente. El rendimiento de una etapa de cromatografía está limitado normalmente por la capacidad de la resina de cromatografía para la proteína de interés. Con una mayor carga de proteína en la columna, la resolución de la proteína de interés con respecto a las impurezas disminuye frecuentemente.

[0011] Se sabe que los polielectrolitos forman complejos con proteínas que toman las formas de complejos solubles (Dellacherie, E. (1991) *Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr.* 32(1):602), precipitados amorfos (Mattiasson et al (1998) *Polym. Plast. Technol. Eng.* 37(3):303-308; Clark et al (1987) *Biotech. Progress* 3(4):241; Fisher et al (1988) *Biotechnol. Bioeng.* 32:777; Shieh et al (1991) *Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr.* 32(1):606; Sternberg et al (1974) *Biochimica et Biophysica Acta* 342:195-206; WO 2004/014942), o coacervatos (Wang et al (1996) *Biotechnol. Prog.* 12:356-362; Veis, A. (1991) *Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. Prepr.* 32(1) 596). La proteólisis con papaína de anticuerpos monoclonales en presencia de antígeno-polición (ácido polimetacrílico) produce fragmentos de Fab (Dainiak et al (2000) *Analytical Biochem.* 277:58-66).

[0012] Los complejos de proteína-polielectrolito coacervan, es decir, se separan en dos fases líquidas distintas donde la fase de coacervado contiene la mayoría del complejo y la otra fase es la fase en equilibrio (Burgess, D.J. "Complex Coacervation: Microcapsule Formation" en *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Dubin, P.L., et al Eds. (1994) Springer-Verlag, Berlin; Dubin et al (1994) *Sep. Purif. Methods* 23:1-16). La coacervación de polielectrolito de proteínas es un proceso complicado y no es útil para una amplia gama de proteínas. Las asociaciones intermoleculares en complejos de proteína-polielectrolito son debidas a interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas (Cooper et al (2005) *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10:52-78; Mattison et al (1999) *Macromol. Symp.* 140:53-76). Aunque se sabe que la adición de un polielectrolito a una solución de proteínas puede conducir a la formación de complejos proteína-polielectrolito y grupos más grandes y finalmente a un coacervado y/o precipitación, el proceso inverso puede aparecer después de la adición adicional de polielectrolito a través de lo cual tiene lugar la redisolución de proteína, frustrando el intento de aislamiento o purificación de las proteínas (Carlsson et al (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125:3140-3149). La precipitación de proteínas utilizando polielectrolitos puede proporcionar una alternativa rentable a la separación cromatográfica. Utilizando esta técnica, puede ser posible explotar la química funcional de las técnicas cromatográficas para conseguir un nivel similar de purificación de proteínas en solución. En particular, el rendimiento de la etapa de precipitación ya no estaría limitada por la capacidad de una resina cromatográfica particular. WO2004/092393 describe la purificación de un polipéptido heterólogo a partir de un caldo de fermentación microbiano u homogenato, mediante la adición de una solución de lactato de etacridina al caldo o al homogenato para precipitar las impurezas de la célula huésped bajo condiciones en las que la mayoría de polipéptido permanece soluble, y la separación entonces del polipéptido deseado. US5,641,870 se refiere a la purificación de anticuerpos utilizando la cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo, y también describe etapas de purificación adicionales. En un ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se extraen de *E. coli* mediante la homogenización de las células, la adición de polietilenimina y agua, a continuación la centrifugación del homogenato para separar el anticuerpo en el sobrenadante. Riske et al. *J Biotech.* 128:813-823 2007 describe la utilización de quitosano como floculante en el cultivo de células de mamífero, indicando que mejora espectacularmente el rendimiento de purificación sin afectar de manera adversa a la recuperación del anticuerpo monoclonal.

[0013] DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0014] La presente invención proporciona métodos que se refieren al aislamiento y purificación de proteínas derivadas de fluidos de cultivos celulares, mediante la precipitación de una proteína con un polielectrolito polianión según las reivindicaciones adjuntas.

[0015] La etapa de precipitación puede ir seguida de una cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, y otras etapas de precipitación.

[0016] Los métodos de la invención incluyen un proceso sin afinidad para la purificación de un anticuerpo según las reivindicaciones adjuntas.

[0017] Un aspecto de la invención es un método de purificación de anticuerpos que comprende:

[0018] (a) ajustar la acidez o concentración de sal de una mezcla que contiene un anticuerpo donde el anticuerpo deriva de un fluido de cultivo celular recogido y el fluido de cultivo celular recogido deriva de un cultivo de células de mamífero;

[0019] (b) añadir un polielectrolito cargado negativamente seleccionado entre ácido polivinilsulfónico, polivinilsulfonato, ácido poliestirensulfónico, y ácido poliacrílico y donde el polielectrolito cargado negativamente tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1.000.000 Da, mediante lo cual se forma un precipitado de proteína-polielectrolito;

[0020] (c) separar el precipitado de proteína-polielectrolito de impurezas seleccionadas entre agregados de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de células huésped, insulina, gentamicina, ADN, y proteína A arrastrada;

[0021] (d) aislar el precipitado de proteína-polielectrolito; y

[0022] (e) resuspender el precipitado de proteína-polielectrolito en una solución acuosa.

[0023] BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024] La figura 1 muestra las etapas del proceso para la purificación de flujos de proteína A purificados del fluido de cultivo celular recogido (HCCF) seguido de: columna izquierda – cromatografía de intercambio catiónico (Sephacrose™ fluido rápido, SPSFF), a continuación cromatografía de intercambio aniónico (QSFF); columna central - QSFF; o columna derecha – precipitación con ácido polivinilsulfónico (PVS) a pH 7, a continuación QSFF.

[0025] La figura 2 muestra las etapas del proceso de purificación de flujos de SPSFF purificados de fluido de cultivo celular recogido (HCCF) seguido de: columna izquierda - QSFF; o columna derecha – precipitación con PVS a pH 7, a continuación QSFF.

[0026] La figura 3 muestra las etapas del proceso para la captura directa y la purificación del anticuerpo de HCCF: columna izquierda – precipitación con PVS a pH 5, seguido de QSFF, a continuación SPSFF; o precipitación con PVS a pH 7, seguido de QSFF, a continuación SPSFF.

[0027] La figura 4 muestra las curvas de solubilidad en PVS de rhuMab 2H7 (1800 Da) a pH 5 a 3,0 y 5,6 mS/cm (flujo de proteínas A).
mS = milisiemens, una unidad de conductividad

[0028] La figura 5 muestra las curvas de solubilidad en PVS de rhuMab 2H7 (1800 Da) a pH 7 a 0,7, 1,5, 3,0 y 4,7 mS/cm (flujo de proteínas A)

[0029] La figura 6 muestra las curvas de solubilidad en PVS de rhuMab 2H7 (1800 Da) a pH 7 a 0,8; y 1,5 mS/cm (flujo de captura de SPSFF)

[0030] La figura 7 muestra las curvas de solubilidad en PVS de rhuMab 2H7 (1800 Da) a pH 5 y 3,0 mS/cm; y a pH 7 y 0,7 mS/cm (HCCF).

[0031] La figura 8 muestra las curvas de solubilidad que comparan la precipitación con PVS (1800 Da) con la precipitación con PAA (1200 y 8000 Da) a pH 5, 5 mS/cm del anticuerpos anti-CD20, 2H7.

[0032] La figura 9 muestra las curvas de solubilidad que comparan la precipitación con PVS (1800 Da) con la precipitación con PAA (1200 y 8000 Da) a pH 7, 1,5 mS/cm del anticuerpos anti-CD20, 2H7.

[0033] La figura 10 muestra curvas de solubilidad del anticuerpo anti-CD20 (rituximab) a pH 7, 1,5 mS/cm que compara PAA con los pesos moleculares que varían desde 1200 a 1.100.000 Da.

[0034] La figura 11 muestra una tabla de resumen de resultados de procesamiento cascada abajo para anti-CD20 rhuMab 2H7: (a) HCCF procesado a través de proteína A; (b) HCCF procesado a través de SPSFF; (c) precipitación con PVS de HCCF.

[0035] La figura 12 muestra las curvas de solubilidad de Apomab en PVS (1800 Da) a pH 5,5 y 5,1 mS/cm; pH 6,0 y 3,0 mS/cm; pH 6,0 y 5,5 mS/cm.

[0036] La figura 13 muestra las curvas de solubilidad de Apomab en PVS (1800 Da) a pH 6,5 y 1,5 mS/cm; pH 6,5 y 3,2 mS/cm; y pH 7,0 y 0,7 mS/cm.

[0037] La figura 14 muestra una fotografía de matraces que contienen flujos de Proteína A de Apomab a pH 5,5 que contienen: (izquierda) sin PVS (0%), (centro) PPVS al 0,1% (p/v), y (derecha) PVS al 1% (v/v).

[0038] La figura 15 muestra curvas de solubilidad de anti-cMet en PVS (1800 Da) a pH 4 y 2 mS/cm; pH 5 y 1 mS/cm; pH 5 y 2,4 mS/cm; pH 6 y 0,5 mS/cm; pH 7 y 0,5 mS/cm.

[0039] La figura 16 muestra etapas de proceso para la captura directa y purificación del anticuerpo rhuMab 2H7 a partir de CCF: columna izquierda - centrifugación a HCCF, seguido de la precipitación de anticuerpo con PVS, a continuación QSFF; columna derecha - floculación/precipitación con poliarginina de impurezas, centrifugación a HCCF, precipitación de anticuerpos con PVS, a continuación QSFF.

[0040] La figura 17 muestra etapas de proceso para la purificación del anticuerpo rhuMab 2H7 a partir del fluido de cultivo celular recogido (HCCF) seguido de: columna derecha - Prosep vA, cromatografía de intercambio catiónico (SEPHAROSE™ Fast Flow, SPSFF), a continuación cromatografía de intercambio catiónico (QSFF); columna derecha - precipitación con poliarginina, Prosep vA, SPSFF, a continuación QSFF.

[0041] La figura 18 muestra el mismo proceso para la purificación del anticuerpo rhuMab 2H7 a partir del fluido de cultivo celular recogido (HCCF) cm en la Figura 17, con la eliminación de la etapa Prosep vA: columna izquierda - SPSFF entonces QSFF; columna derecha - precipitación con poliarginina, SPSFF, entonces QSFF.

[0042] La figura 19 muestra etapas de proceso para la purificación del anticuerpo rhuMab 2H7 a partir del fluido de cultivo celular recogido (HCCF) seguido de: columna izquierda - precipitación de anticuerpos con PVS, a continuación QSFF; columna derecha - precipitación con poliarginina, precipitación de anticuerpos con PVS, a continuación QSFF.

[0043] La figura 20 muestra una curva de solubilidad de CCF con rhuMab 2H7 con poliarginina 110 kDa.

[0044] La figura 21 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7 - poliarginina 42 kDa.

[0045] La figura 22 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7 - poliarginina 110 kDa.

[0046] La figura 23 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 - poliarginina 42 kDa.

[0047] La figura 24 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 - poliarginina 110 kDa.

[0048] La figura 25 muestra curvas de solubilidad de precipitación con PVS de CCF con rhuMab 2H7 floculado con poliarginina 110 kDa al 0,075% p/v.

[0049] La figura 26 muestra curvas de ruptura de SPSFF con flujo de proteína A generadas a partir del HCCF precipitado con poliarginina como carga

[0050] La figura 27 muestra curvas de ruptura de SPSFF con HCCF generadas a partir de poliarginina precipitada como carga.

[0051] La figura 28 muestra la electroforesis en gel de la inhibición de la reducción de anticuerpo en Mab 2H7. HCCF 4-12% BT, tampón MOPS, tinción Sypro ruby, 2 ug de carga de HCCF, 5 min. 70 °C, exposición de 9 s., 2 F/T Run 7, incubación a temperatura ambiente en minilatas SS, las muestras de 500 µl (microlitros) se congelaron inmediatamente a -70°C.

[0052] La figura 29 muestra curvas de solubilidad de flujo de proteína A con rhuMab C2B8 - poliisina 2,5kDa.

[0053] La figura 30 muestra curvas de solubilidad de flujo de proteína A con rhuMab C2B8 – polilisina 50 kDa.

[0054] La figura 31 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab C2B8 – polilisina 50 kDa.

[0055] La figura 32 muestra curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab C2B8 – polilisina 225 kDa.

[0056] La figura 33 muestra curvas de solubilidad de anticuerpos anti-CD20 humanizados con muestras de 1800 Da a 1132 kDa de sulfonato de poliestireno (PSS) de 0,00% a 0,20% a pH 7 y conductividad de 12 mS/cm.

[0057] La figura 34 muestra la representación del Vmax de capacidad (medido en gramos de anticuerpos por área de filtración) frente a la caída de presión para cada medio del filtro: AIHC, BIHC, C0HC, 45CE, 20CE, 30CE.

[0058] La figura 35 muestra el efecto de la velocidad de flujo variante a través del rendimiento en términos de volumen de tampón necesario para conseguir la resolubilización completa del precipitado 2H7-proteína de PVS-polielectrolito del medio C0HC del filtro MILLISTAK+®.

LMH = litros por metro cuadrado por hora, una medida de la velocidad de flujo.

[0059] La figura 36 muestra los efectos de dos intervalos de flujo (flujo de tampón de resolubilización en LMH) en la resolubilización de proteína del filtro MILLISTAK+® C0HC (precipitado 2H7-proteína PVS-polielectrolito).

[0060] La figura 37 muestra la disposición del sistema de acondicionamiento de HCCF/precipitación de PVS en línea.

[0061] La figura 38 muestra el rendimiento de recuperación de anticuerpo con un acondicionamiento/precipitación continuo de la carga de alimentación.

[0062] DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE EJEMPLO

[0063] A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas que se acompañan.

[0064] DEFINICIONES

[0065] A menos que se afirme lo contrario, los siguientes términos y frases, tal como se utilizan en la presente invención, pretenden tener los siguientes significados:

[0066] El término "fluido de cultivo celular recogido", también indicado como HCCF, significa el fluido de cultivo celular procariota o eucariota del que se han eliminado las células, mediante medios que incluyen centrifugación o filtración. El cultivo celular es el proceso por el cual las células procariotas o eucariotas se desarrollan bajo condiciones controladas. El término "cultivo celular" se refiere al cultivo de células derivadas de eucariotas multicelulares, incluyendo células animales o procariotas monocelulares, incluyendo bacterias y células. Los cultivos de células eucariotas incluyen células de mamífero, tales como células de Ovario de Hámster Chino, hibridomas y células de insectos. Con un recipiente de cultivo celular apropiado, se pueden obtener proteínas secretadas a partir de células dependientes de anclaje o líneas de células en suspensión. Los cultivos de células de mamífero incluyen células de Ovario de Hámster Chino

[0067] El término "fermentación microbiana" significa un cultivo celular de bacterias o levadura que se modifica para producir productos químicos, tales como proteínas. La fermentación se utiliza para propagar bacterias y levadura clonadas, así como otros microorganismos, y producir proteínas valiosas. La productividad celular y el crecimiento de estos organismos se maximizan mediante el suministro de medios de crecimiento particulares y el control y varios factores ambientales (tales como el pH, la temperatura y la aeración). El fluido de fermentación bacteriana puede derivar de E. coli.

[0068] El término "anticuerpo" se utiliza aquí en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies.

[0069] Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno diana tiene en general numerosos sitios de unión, también denominado epítomos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. De este modo, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

[0070] El término "anticuerpo," tal como se utiliza en la presente invención, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, pero sin limitación, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociadas con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina descrita en la presente invención puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o la subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o conejo.

[0071] "Fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diabodies; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiopáticos (anti-Id), CDR (región determinante de complementariedad, ECD (dominio extracelular), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0072] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar no contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo no ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención se pueden fabricar mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al (1975) Nature 256:495, o se pueden fabricar mediante métodos de ADN recombinante (US 4816567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

[0073] Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico particular (por ejemplo, un antígeno de células cancerosa, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un producto químico, un ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (MAb) para un antígeno de interés mediante la utilización de cualquier técnica conocida en el sector que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en un cultivo. Éstas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Köhler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al (1983) Immunology Today 4:72), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los MAbs de utilización en esta invención se pueden cultivar in vitro o in vivo.

[0074] Los anticuerpos monoclonales útiles para los métodos de la invención incluyen trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289; US 5,725,856); anticuerpos anti-CD20, tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" (US 5736137); rituximab (RITUXAN®), ocrelizumab, una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 (US 5721108; WO 04/056312) o tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al (1993) Chest, 103:932, y WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF, que incluyen anticuerpos anti-VEGF humanizados madurados para afinidad, tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, Inc., Kim et al (1992) Growth Factors 7:53-64, WO 96/30046, WO 98/45331); anticuerpos anti-PSCA (WO 01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizados del mismo (WO 00/75348); anti-CD11a (US 5622700; WO 98/23761; Steppe et al (1991) Transplant Intl. 4:3-7; Hourmant et al (1994) Transplantation 58:377-380); anti-IgE (Presta et al (1993) J. Immunol. 151:2623-2632; WO 95/19181); anti-CD18 (US 5622700; WO 97/26912); anti-IgE, incluyendo E25, E26 y E27 (US5714338; US 5091313; WO 93/04173; US 5714,338); anticuerpo anti-receptor Apo-2 (WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF-alfa, incluyendo cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (US 5672347; Lorenz et al (1996) J. Immunol. 156(4): 1646-1653; Dhainaut et al (1995) Crit. Care Med. 23(9):1461-1469); anti-Factor tisular (TF) (EP 0 420 937 B1); integrina alfa 4 beta 7 antihumana (WO 98/06248); anticuerpo 225 anti-EGFR, quimerizado o humanizado (WO 96/40210); anticuerpos anti-CD3, tales como OKT3 (US 4515893); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac, tales como CHI-621 SIMULECT® y ZENAPAX® (US 5693762); anticuerpos anti-CD4, tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al (1996) Arthritis Rheum 39 (1):52-56); anticuerpos anti-CD52, tales como CAMPATH-1H (Riechmann et al (1988) Nature 332:323-337); anticuerpos anti-receptor de Fc, tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc gamma RI como en Graziano et al (1995) J. Immunol. 155(10): 4996-5002; anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA), tales como hMN-14 (Sharkey et al (1995) Cancer Res. 55 (23Suppl): 5935s-5945s; anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de

mama, incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al (1995) Cancer Res. 55(23):5852s-5856s; y Richman et al (1995) Cancer Res. 55(23 Suppl): 5916s-5920s); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon, tales como C242 (Litton et al (1996) Eur J. Immunol. 26(1):1-9); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis et al (1995) J. Immunol. 155(2):925-937); anticuerpos anti-CD33, tales como Hu M195 (Jurcic et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22, tales como LL2 o LymphoCide (Juweid et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s); anticuerpos anti-EpCAM, tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-Gp11b/IIIa, tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV, tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV, tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH, tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis, tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpos anti-CA 125 OvaRex; anticuerpos anti-epítipo GD43 idiopático BEC2; anticuerpo anti-alfa v beta3 VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humanas, tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano dirigido contra gangliósido GD3; anti-carcinoma de célula escamosa humana (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno de leucocitos humanos (HLA), tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

[0075] Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden producir mediante cualquiera de un conjunto de técnicas conocidas en el sector (Teng et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-7312; Kozbor et al (1983) Immunology Today 4:72-79; and Olsson et al (1982) Methods in Enzymology 92:3-16).

[0076] El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación (WO 94/04690; Suresh et al (1986) Methods in Enzymology, 121:210; Rodrigues et al (1993) J. of Immunology 151:6954-6961; Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167; Carter et al (1995) J. of Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al (1998) Nature Biotechnology 16:677-681. Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (Milstein et al (1983) Nature 305:537-539; WO 93/08829; Traunecker et al (1991) EMBO J. 10:3655-3659. Utilizando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para la conjugación como ADC en el tratamiento o la prevención de enfermedad tal como se define aquí.

[0077] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La proteína de fusión puede ser con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. La primera región constante de cadena pesada (C_H1) puede contener el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las proteínas de fusión. Los ácidos nucleicos con secuencias 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 se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo.

[0078] Los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivar biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación reactivos que forman puentes disulfuro, y pueden comprender los anticuerpos completos o fragmentos de los mismos (EP 105360; WO 83/03679; EP 217577).

[0079] El anticuerpo puede ser un fragmento funcionalmente activo, derivado o análogo de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales, o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a células tumorales o matriz tumoral. En este aspecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de producir anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del que deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización de ejemplo, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede aumentar mediante la eliminación de las secuencias de armazón (*framework*) y CDR que son C-terminales a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden utilizar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica, por ejemplo, el ensayo BIAcore (Kabat et al, (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat et al (1980) J. of Immunology 125(3):961-969).

[0080] Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos, tales como, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que contienen la región variable, la región contante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, se pueden producir mediante la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que se pueden generar mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Otros anticuerpos útiles son dímeros de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fv o anticuerpos de cadena única (SCAs) (por ejemplo, tal como se describe en US 4946778; Bird (1988) Science 242:423-42; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Ward et al (1989) Nature 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

[0081] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (US 4816567; y Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Un anticuerpo quimérico es una molécula en que diferentes partes derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal humano y regiones constantes de inmunoglobulina humana (US 4816567; US 4816397). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "privatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de una primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio etc) y secuencias de región constante humana.

[0082] Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprende tanto partes humanas como no humanas, se pueden producir utilizando técnicas de ADN recombinante estándar (WO 87/02671; EP 184,187; EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; US 4816567; EP 12023; Berter et al (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al (1987) Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al (1985) Nature 314:446-449; y Shaw et al (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80 :1553-1559 ; Morrison (1985) Science 229 :1202-1207 ; Oi et al (1986) BioTechniques 4 :214 ; US 5225539 ; Jones et al (1986) Nature 321 :552-525 ; Verhoeyan et al (1988) Science 239:1534; y Beidler et al (1988) J. Immunol. 141:4053-4060;

[0083] Los anticuerpos completamente humanos se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes endógenos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se redistribuyen durante la diferenciación de células B, y posteriormente, experimentan un cambio de clase y una mutación somática. De este modo, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; patente de Estados Unidos Nos. 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806). Otros anticuerpos humanos se pueden obtener a partir de Fuentes comerciales, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

[0084] Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica referida como "selección guiada". En esta estrategia, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al (1994) Biotechnology 12:899-903). Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581).

[0085] El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en que el anticuerpo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en el extremo N-terminal o C-terminal con la secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, tal como una parte de la proteína de por lo menos 10, 20 ó 50 aminoácidos) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

[0086] Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo mantenga su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, pero sin que sea limitante, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado posteriormente, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, separación proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, separación química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

[0087] Entre los ejemplos de anticuerpos CD20 se incluyen: "C2B8," ahora rituximab (RITUXAN®/MABTHERA®) (US 5736137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con ytrio 90 Y2B8 o ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®, Biogen Idec, Inc. US 5736137); 2B8 depositado con la ATCC bajo el número de acceso no. HB11388 el 22 de junio, 1993); IgG2a murino "B1," también denominado tositumomab, opcionalmente marcado con 131I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "tositumomab yodo I131" (BEXXAR®) disponible comercialmente en Corixa (US 5595721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (por ejemplo, Press et al (1987) Blood 69(2):584-591 y variantes del mismo incluyendo "adherido al armazón" o 1F5 humanizado (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC depósito HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (US 5677180); ocrelizumab, una variante humanizada de 2H7 y otras variantes de 2H7 (WO 2004/056312; US 5721108); anticuerpos de alta afinidad completamente humano HUMAX-CD20™ dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de células B (Genmab, Dinamarca). Véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, (2003) Drug Discovery Today 8:503-510 y Cragg et al (2003) Blood 101: 1045-1052); los anticuerpos monoclonales establecidos en WO 2004/035607 y WO 2005/103081 (Teeling et al., GenMab/Medarex); los anticuerpos que tienen cadenas de azúcares complejas unidas a la región Fc descritos en US 2004/0093621 (Shitara et al.); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (WO 2005/000901, Tedder et al.), tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25, y MB20-11; proteínas de cadena única que se unen a CD20 (US 2005/0186216; US 2005/0202534; US 2005/0202028; US 2005/0202023); moléculas de unión a CD20, tales como las series AME de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos AME-133™ (WO 2004/103404; US 2005/0025764); y anticuerpos CD20 con mutaciones en Fc (WO 2005/070963); moléculas de unión a CD20 (WO 2005/016969; US 2005/0069545); anticuerpos biespecíficos (WO 2005/014618); anticuerpos monoclonales LL2 humanizados (US 2005/0106108); anticuerpos B-Lyl quiméricos o humanizados para CD20 (WO2005/044859; US 2005/0123546); anticuerpo A20 o variantes del mismo, tales como anticuerpo A10 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) e IMMUN-106 (US 2003/0219433); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles de International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al (1987) en: Leukocyte Typing III, McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press). Anticuerpos CD20 de ejemplo incluyen anticuerpos CD20 quiméricos, humanizados o humanos, tales como rituximab, un anticuerpo 2H7 humanizados, anticuerpo A20 quimérico o humanizado, tal como HUMAX-CD20™, anticuerpo CD20 humano (Genmab), e inmunoglobulinas/proteínas de unión a CD20 (Trubion Pharm Inc.).

[0088] Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos.

[0089] El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión de receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

[0090] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir a su vez en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0091] El término "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierto grado de un polipéptido de secuencia nativa. Normalmente, las variantes de las secuencias de aminoácidos poseerán por lo menos aproximadamente un 70% de identidad en la secuencia con por lo menos un dominio de unión a receptor de un anticuerpo nativo o con por lo menos un dominio de unión a ligando de un receptor nativo, y preferiblemente, será por lo menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente un 90% homóloga en la secuencia con dichos dominios de unión a receptor o ligando. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, delecciones y/o inserciones en ciertas posiciones en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan por los nombres convencionales, códigos de una letra y tres letras.

[0092] "Identidad en la secuencia" se define como el porcentaje de residuos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. Los métodos y programas informáticos para la alineación son conocidos en la técnica. Uno de dichos programas es "Align 2," de Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

[0093] EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

[0094] Las proteínas recombinantes se expresan mediante la clonación de ADN a partir de vectores y métodos conocidos en la técnica. Las proteínas para métodos de purificación de electrolito se pueden producir a partir de células huésped adecuadas, tales como células procariotas, levadura y eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas para este objetivo se incluyen *eubacteria*, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrita en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.

[0095] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo de unión a CD20. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Sin embargo, están disponibles habitualmente y son útiles aquí géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. Niger*.

[0096] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se pueden derivar de organismos multicelulares eucariotas. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0097] La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., (1977) J. Gen Virol. 36:59); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)) Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251; células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0098] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0099] Las células huésped utilizadas para producir anticuerpos para los métodos de la presente invención se pueden cultivar en un conjunto de medios. Los medios de crecimiento comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al (1979) Meth. Enz. 58:44, Barnes et al (1980) Anal. Biochem.102: 255, US 4767704; US 4657866; US 4927762; US 4560655; US 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como MES y HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINATM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

[0100] Una vez se ha obtenido el fluido de cultivo celular recogido que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula se intenta normalmente utilizando una combinación de diferentes

técnicas cromatográficas. Estas técnicas separan mezclas de proteínas en base a su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño. Existen varias cromatografías diferentes disponibles para cada una de estas técnicas, permitiendo un ajuste preciso del esquema de purificación a la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que se puede provocar que las proteínas se muevan a diferentes velocidades bajando por una larga columna, consiguiendo una separación física que incrementa a medida que van bajando por la columna, o que se adhieran selectivamente al medio de separación, eluyéndose entonces diferencialmente mediante disolventes diferentes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna, y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "flow-through".

[0101] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se secreta directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, el residuo celular particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración, tales como anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. Coli* (Carter et al (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). La pasta celular se puede descongelar en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. El residuo celular se puede eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero en general utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas, tales como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir anticuerpos para evitar el crecimiento de contaminantes extraños.

[0102] Los métodos tradicionales de purificación de proteínas expresadas de células incluyen al cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, electroforesis en gel, diálisis y combinaciones de los mismos (Fahrner, R.L. et al (2001) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18:301-327). La proteína A se utiliza habitualmente como ligando de afinidad que se puede inmovilizar en varios soportes y permite el enriquecimiento en una etapa inicial de fluidos de cultivo celular recogido (HCCF) que contienen proteínas expresadas. La proteína A es un adsorbente útil para la cromatografía de afinidad de proteínas, tales como anticuerpos, que contiene una región Fc. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una afinidad elevada (aproximadamente 10^{-8} M para IgG humana) a la región Fc de anticuerpos (Sulkowski, E. (1987) *Protein Purification: Micro to Macro*, pgs 177-195; Chadha et al. (1981) *Preparative Biochemistry* 11(4):467-482; Reifsnnyder et al (1996) *J. Chromatography* 753:73-80; US 6127526; 6333398). La proteína A se puede inmovilizar sobre una fase sólida, tal como vidrio, sílice, agarosa o poliestireno. La fase sólida puede ser una columna de purificación o una fase discontinua de partículas discretas, tales como una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico, o recubierta con un reactivo (tal como glicerol) que pretende evitar la adherencia no específica de contaminantes a la fase sólida (US 6870034). La columna PROSEP A™, disponible comercialmente de Bioprocessing Limited, es un ejemplo una columna de vidrio de poro controlado de Proteína A que está recubierta con glicerol. Otros ejemplos de columnas contempladas aquí incluyen la columna POROS 50 A™ (poliestireno) o la columna rProtein A SEPHAROSE FAST FLOW™ (agarosa). La fase sólida para la cromatografía de Proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado. Por ejemplo, el tampón de equilibrio puede ser Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1.

[0103] Cuando se inmoviliza sobre el medio de cromatografía, la proteína A proporciona una técnica para purificar anticuerpos recombinantes porque se puede unir selectivamente a anticuerpos en soluciones complejas, permitiendo que pase impurezas, tales como proteínas de células huésped y moléculas pequeñas. La solubilidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$, humanas (Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al (1986) *EMBO J.* 5:1567-1575). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy frecuentemente agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como de vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparin SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), "chromatofocusing", SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0104] POLIELECTROLITOS

[0105] Los polielectrolitos son polímeros solubles en agua comprendidos de unidades monoméricas con carga. Las unidades monoméricas de un polielectrolito de la invención portan un grupo electrolito (función cargada) que experimenta la disociación de protones (ionización) en solución acuosa según la acidez (pH). Entre los ejemplos de funciones cargadas de polielectrolitos se incluyen, pero sin limitación, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido

carboxílico, y aminas, y sus respectivos iones: sulfonato, fosfonato, carboxilato y amonio. La disociación afecta a la fuerza iónica de la solución y la conductividad eléctrica.

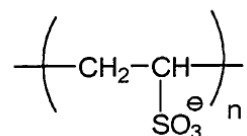
[0106] Los polielectrolitos útiles para los métodos de la invención pueden tener un peso molecular que varía desde aproximadamente mil (1000) daltons (Da) a aproximadamente un millón (1.000.000) de daltons. Los polielectrolitos de la invención se pueden utilizar como una mezcla de un cierto tipo de unidad monomérica repetitiva, pero con un intervalo amplio de longitudes de cadena, es decir, un intervalo de peso molecular desde aproximadamente 1200 daltons (Da) a aproximadamente un millón (1.000.000) de daltons. La mezcla puede ser un intervalo estrecho, por ejemplo, desde aproximadamente 1200 Da a aproximadamente 2400 Da, o desde aproximadamente 4000 Da a aproximadamente 8000 Da. El peso molecular promedio y el perfil de la distribución de pesos moleculares se pueden controlar bajo ciertas condiciones de polimerización de las unidades monoméricas, tales como concentración, iniciador de la polimerización o catalizador, temperatura o tiempo. El peso molecular promedio y el perfil de la distribución de pesos moleculares de un polielectrolito también se pueden seleccionar bajo ciertos métodos de purificación preparativa.

[0107] Los polielectrolitos aniónicos cargados negativamente y los polielectrolitos catiónicos cargados positivamente se pueden utilizar en la reacción de precipitación. Cuando el pH de la solución es inferior al pI de un anticuerpo particular, el anticuerpo se carga positivamente. Bajo estas condiciones, un polielectrolito catiónico puede precipitar impurezas y dejar el anticuerpo de interés en solución. A la inversa, un polielectrolito aniónico puede precipitar el anticuerpo formando un precipitado de proteína-polielectrolito, dejando las impurezas en solución. Otros factores en la selección de polielectrolitos para los métodos de la invención incluyen la estabilidad y reactividad de grupos funcionales, el peso molecular, la densidad de carga y la rigidez de la cadena.

[0108] Los polielectrolitos de polianión de la invención incluyen: ácido poliacrílico (PAA), polivinilsulfonato (PVS), ácido poliestirensulfónico (PSS, sal metálica de poli(4-vinilbencenosulfonato))

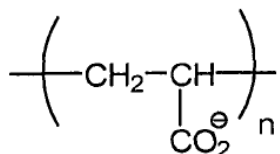
[0109] El ácido poliacrílico (PAA) y el ácido polivinilsulfónico (PVS), y sus aniones, poliacrilato y polivinilsulfonato, respectivamente, son polielectrolitos útiles para los métodos de la invención. PAA tiene propiedades estructurales similares con PVS. Ambos son poliméricos y tienen esqueletos de carbono lineales. Los dos polielectrolitos difieren en sus grupos funcionales. PVS tiene un grupo funcional de ácido sulfónico que le da un pKa de aproximadamente uno. En cambio, PAA tiene un grupo funcional de ácido carboxílico y un pKa de aproximadamente cinco. PVS está disponible en un peso molecular único que se determina que es un promedio de 1800 Da mediante exclusión de tamaño, donde el n promedio es de aproximadamente 10-20, con detección por dispersión de luz dinámica. PAA está disponible comercialmente en múltiples pesos moleculares, incluyendo 1200 y 8000, donde n promedio es aproximadamente 15-20 y 100-120, respectivamente. PAA y PVS se adquirieron de Sigma-Aldrich Co., St. Louis MO, Polysciences Inc., Warrington, PA, y Carbomer, Inc., San Diego, CA.

[0110]



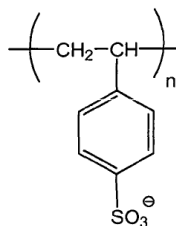
Ácido polivinilsulfonato (PVS)

[0111]



Ácido poliacrílico (PAA, poliacrilato)

[0112]



Sulfonato de poliestireno (PSS)

[0113] PRECIPITACIÓN DE POLIELECTROLITOS EN LA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

5 [0114] La precipitación de polielectrolitos se puede utilizar para separar anticuerpos de las impurezas durante la purificación. Estas impurezas incluyen impurezas de células huésped, tales como proteínas CHO (CHOP) y proteínas de E. coli (ECP), componentes de cultivo celular, tales como insulina, gentamicina y ADN, impurezas del proceso, tales como proteína A arrastrada, e impurezas relacionadas con el producto, tales como agregados y fragmentos de anticuerpos. La etapa de precipitación puede servir como sustitución a separaciones cromatográficas
10 existentes. Alternativamente, la precipitación con polielectrolitos con de proteínas se puede utilizar como una etapa de captura directa a partir de un fluido de cultivo celular recogido (HCCF) de un cultivo eucariota o procariota, o como una etapa de purificación intermedia. Además, la precipitación de polielectrolitos se puede utilizar como una etapa de depuración en la purificación de proteínas, depuración del fluido de cultivo celular, incluyendo el HCCF. Los polielectrolitos pueden formar un material floculante en un fluido de cultivo celular que se deposita y permite la rápida y eficiente depuración, enriquecimiento, precipitación o purificación de mezclas que contienen una proteína, tal como
15 un anticuerpo expresado en un cultivo de células procariotas o eucariotas. Los métodos de purificación con polielectrolitos de la invención pueden suplantar las operaciones de recogida, tales como las operaciones de centrifugación, filtración y cromatografía. Los métodos de purificación con electrolitos de la invención proporcionan ventajas sorprendentes e inesperadas en la purificación de anticuerpos.

20 [0115] Las condiciones a optimizar para la precipitación de electrolitos incluyen el pH de la solución, conductividad, tampones, concentración de proteínas, concentración de polielectrolitos, así como la velocidad y el tipo de agitación, y la velocidad de adición de los polielectrolitos.

25 [0116] La precipitación se puede realizar en un reactor con agitación. El pH y la conductividad del flujo de anticuerpos se pueden ajustar a las condiciones objetivo en base a las condiciones óptimas identificadas a partir de las curvas de solubilidad. Se añade y se mezcla el polielectrolito. La velocidad y el tipo de agitación pueden influir en la eficiencia de la precipitación y el tiempo de precipitación. La precipitación sigue a la adición del polielectrolito. El precipitante se separa del sobrenadante utilizando filtración o centrifugación. Para la precipitación de polielectrolitos
30 aniónicos donde se utiliza la filtración, el precipitante se lava a través de un tampón de lavado. El precipitante que comprende un anticuerpo se resuspendería posteriormente y se procesaría cascada abajo. También puede ser posible realizar la precipitación en línea, es decir, son recipiente de mezclado, donde el flujo de anticuerpos se ajustaría al pH objetivo y a continuación se añadiría el polielectrolito. La precipitación no tendría lugar hasta que el flujo se diluyera lo que podría realizarse en línea en el aparato de filtración o la centrifuga. Alternativamente, tras el
35 ajuste del flujo de anticuerpos al pH objetivo, la dilución se realizaría en línea, seguido de la adición en línea del polielectrolito antes del aparato de filtración o la centrifuga.

[0117] En una ilustración, la hormona de crecimiento humano (pl 5,2) cuando se cristaliza o precipita en un tampón a pH 7, se cargaría negativamente y, por tanto, interaccionaría o complejaría con polielectrolitos catiónicos. De manera
40 similar, los anticuerpos monoclonales, tales como rituximab y trastuzumab, con pls superiores a 9, serían capaces de complejarse con polielectrolitos aniónicos en tampones neutros. La estimación de la carga neta de la proteína se puede calcular una vez la secuencia de aminoácidos se ha averiguado mediante programas disponibles públicamente. Las proteínas ácidas, aquellas proteínas que tienen un contenido de ácido aspártico (pKa 4,5) y ácido glutámico (pKa 4,5) superior, tienen habitualmente pl inferiores a 6-6,4. Por otro lado, las proteínas básicas, aquellas
45 proteínas que tienen un contenido superior de histidina (pKa 6,2), lisina (pKa 10,4) y arginina (pKa 12), habitualmente tienen pl superiores a aproximadamente 7,5 - 8. A diferencia de ambas, las proteínas neutras, aquellas que habitualmente tienen cantidades similares de residuos de aminoácidos ácidos y básicos, tienen pl que son neutros (los pl son normalmente aproximadamente de 6,5 a 7,4).

50 [0118] Aunque no es una lista exhaustiva, algunos ejemplos de pl para varias proteínas terapéuticas son las siguientes: eritropoyetina humana recombinante (pl 4); dornasa alfa, rhDNasa (PULMOZYME®) (pl 5); etanercept (ENBREL™) (pl 5,1); insulina (pl 5,4); factor estimulante de colonias de granulocitos (pl 5,5-5,9); TNF alfa (pl 5,6); fibrolasa (pl 6,7); IL-1 beta (pl 6,9); activador de plasminógeno de tejido recombinante (pl 6,5-8,5); Ortoclon OKT3 (pl 6,7-7,2); factor VIII (pl 7-7,6); somatotropina bovina (pl 7,4); Interleuquina 2 (pl 7,44); factor de crecimiento del tipo
55 insulina-1 (pl 8,4) y Aprotinina (pl 10,5).

[0119] El método de precipitación de polielectrolitos aniónicos se evaluó como la sustitución de la etapa de intercambio catiónico (SPSFF) para varios ejemplos de anticuerpos (rhuMab 2H7 anti-CD20, rhuMab DR5 Apomab, y anti-cMet), y también como sustitución de la etapa con proteína A (Prosep vA) para rhuMab 2H7 (ocrelizumab). Se pueden purificar otros anticuerpos, y otras proteínas, mediante los métodos de precipitación con polielectrolitos descritos aquí. Se utilizaron las curvas de solubilidad para identificar las condiciones de precipitación efectivas u óptimas (pH, conductividad, y concentración de polímero) para los tres anticuerpos. Una etapa de precipitación con electrolitos demostró la capacidad de reducir las proteínas de células huésped, tales como proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP) y proteínas de *E. coli* ECP), proteína A arrastrada, moléculas pequeñas, tales como insulina y gentamicina, así como fragmentos y agregados de anticuerpos. La etapa de precipitación de polielectrolitos no tuvo un impacto negativo en la actividad biológica de 2H7 medida por la actividad de CDC. El polielectrolito PVS se extrajo de la proteína precipitada hasta un nivel inferior a 1 µg/ml utilizando cromatografía de intercambio aniónico (QSFF).

[0120] Las varias series de etapas de procesamiento se ilustran en los diagramas de flujo de las figuras 1-3. Las etapas se combinaron y se omitió juzgar sus resultados en la purificación de proteínas y la eficiencia del proceso. Un proceso estándar practicado actualmente en la técnica para la purificación de proteínas expresadas a partir de fluido de cultivo celular recogido (HCCF) utiliza tres etapas de cromatografía: (1) una captura de proteína A (Prosep vA), (2) intercambio catiónico (SPSFF) e (3) intercambio aniónico (QSFF), mostradas en la columna de la izquierda de la figura 1. La purificación se intentó mediante la captura de proteína A seguido directamente de la columna de intercambio aniónico (columna central, figura 1). La etapa de intercambio catiónico se puede sustituir por una etapa de precipitación de PVS a pH 7 (columna derecha, figura 1). El fluido de cultivo celular recogido se puede procesar sin captura de proteína A mediante el intercambio catiónico inicial seguido directamente de intercambio aniónico (columna izquierda, figura 2) o mediante precipitación con PVS a pH 7, seguido de intercambio aniónico (columna derecha, figura 2). La precipitación de polielectrolitos se puede realizar como una captura directa a partir de HCCF, seguido del intercambio aniónico, entonces la cromatografía de intercambio catiónico (figura 3). La precipitación de polielectrolitos se realizó a pH 5 (columna izquierda, figura 3) y a pH 7 (columna derecha, figura 3).

[0121] Selección de las condiciones de precipitación para un anticuerpo anti-CD20, rhuMab 2H7

[0122] Se generaron las curvas de solubilidad para el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado recombinante, rhuMab 2H7, sobre un intervalo de fuerzas iónicas. Las curvas de solubilidad son una representación de la proteína residual restante en el sobrenadante después de la precipitación (expresado como el porcentaje) frente a la concentración de PVS expresada como moles de PVS/moles de anticuerpo. Las curvas de solubilidad se generaron para el flujo de proteína A a pH 5 y pH 7 (figuras 4 y 5), el flujo de SPSFF (Figura 6) cuando se utilizó como una etapa de captura directa a pH 7 y para HCCF a pH 6 y pH 7 (Figura 7). Estas curvas se utilizaron para seleccionar el pH, la fuerza iónica y la concentración de PVS en los que se realizarían precipitaciones a escala preparativa.

[0123] Precipitación del flujo de proteína A (Figura 4 y Figura 5)

[0124] Con una concentración creciente de PVS, hubo una precipitación inmediata a pH 5, tal como se indica mediante el descenso en el porcentaje de anticuerpo restante en solución – C/Co, es decir, la concentración de anticuerpo en solución dividido por el anticuerpo total (figura 4). C/Co (%) es el porcentaje (%) de proteína no precipitada dividido por la proteína inicial. Cuando C/Co (%) era 0%, entonces hubo una precipitación completa.

[0125] Al disminuir la fuerza iónica, era posible conseguir un nivel superior de precipitación (4,7 mS/cm frente a 3,0 mS/cm, donde mS es milsiemens, una unidad de conductividad). A pH 7, se requirió una dilución para conseguir una precipitación significativa (figura 5). Con la disminución de la conductividad, hubo un incremento en la precipitación. Se observó una precipitación completa a una conductividad de 0,7 mS/cm. A una conductividad concreta, una vez se observó un nivel máximo de precipitación, la adición de PVS adicional provocó que se redisolviera el precipitante.

[0126] La precipitación del flujo de SPSFF (figura 6) y HCCF (figura 7): Se observaron tendencias similares con el flujo de SPSFF y HCCF. Con la disminución de la conductividad, hubo un incremento en la precipitación. A una conductividad particular, una vez se observó el nivel máximo de precipitación, la adición de PVS adicional provocó que se redisolviera el precipitante.

[0127] Valoración del impacto del peso molecular del polielectrolito

[0128] Las curvas de solubilidad también se generaron comparando PVS con PAA. Las curvas de solubilidad son una representación de la proteína residual restante en el sobrenadante después de la precipitación (expresada en porcentaje) frente a la concentración de polielectrolito expresada como moles de polielectrolito/moles de anticuerpos. Las curvas de solubilidad para PAA (1200 y 8000 Da) y PVS (1800 Da) sobre un intervalo de equivalentes de polielectrolito por anticuerpo anti-CD20 (rhuMab-2H7, pI 9,0, 150 kDa), medido a pH 5 (Figura 8) y pH 7 (Figura 9). La forma de peso molecular más elevado (8000 Da) de PAA, condujo a una mayor precipitación a pH 5 y un valor de

conductividad de 5 mS/cm (Figura 8) en comparación con el peso molecular inferior de los polielectrolitos PAA (1200 Da) y PVS (1800 Da) (Figura 8). Se observó una tendencia similar a pH 7, 1,5 mS/cm (Figura 9). El PAA de peso molecular superior 8000 Da, condujo a una mayor precipitación a pH 7 y un valor de conductividad de 1,5 mS/cm, en comparación con los polielectrolitos de menor peso molecular de PAA 1200 Da y PVS 1800 Da. La unidad básica de conductancia es el siemen (S), denominado anteriormente mho. Las mediciones de la conductividad dependen de la temperatura. Los valores de conductividad se expresan como mS/cm. En ambos casos, el polielectrolito de PAA más grande presentaba un intervalo de operación más estrecho en términos de concentración de polielectrolito requerido para conseguir la máxima precipitación antes de que la adición adicional de polielectrolito causara la redisolución del precipitante. El incremento del peso molecular del polielectrolito puede permitir que la precipitación se realice a conductividades más elevadas.

[0129] Se investigó el efecto del peso molecular de polielectrolito en la precipitación de un anticuerpo anti-CD20 (rituximab) a pH 7 y 1,5 mS/cm con PAA en el intervalo de peso molecular de 1200 Da a 1.100.000 Da (Figura 10). El incremento del peso molecular dio lugar a un aumento de la precipitación bajo estas condiciones. A pH 7 y 1,5 mS/cm no se consiguió la precipitación completa hasta que se utilizó el PAA con un peso molecular mayor de 35.000 Da (35 kDa).

[0130] También se investigó el efecto del peso molecular de polielectrolito en la precipitación de un anticuerpo anti-CD20 humanizado a pH 7 y 12 mS/cm con sulfonato de poliestireno (PSS) en el intervalo de peso molecular de 1800 Da a 1.132.000 Da (Figura 33). Se generaron las curvas de solubilidad para la precipitación con PSS del anticuerpos anti-CD20 humanizado sobre este intervalo de pesos moleculares. El incremento del peso molecular daba lugar a un incremento de la precipitación bajo estas condiciones. A pH 7 y 12 mS/cm no se consiguió una precipitación completa hasta que se utilizó el PSS con un peso molecular superior a 220.000 da (220 kDa). Utilizando PSS se permite que se realice la precipitación a una conductividad más elevada y se minimiza la necesidad de disminuir la conductividad/fuerza iónica de los flujos para conseguir la precipitación completa.

[0131] El efecto del peso molecular del electrolito en la depuración de impurezas se midió bajo las condiciones de la tabla 1 y los resultados del procesado cascada abajo se muestran en la tabal 2. Después de la etapa de precipitación, el PAA de 8000 Da presentaba niveles más elevados de Proteínas de Ovario de Hámster Chino (CHOP) que el PAA de 1200 Da o PVS (tabla 2). En los flujos de QSFF, se observaron niveles de CHOP similares para todos los flujos independientemente del peso molecular del polielectrolito utilizado en la purificación. Ambos pesos moleculares de PAA redujeron la proteína A arrastrada y los fragmentos de anticuerpos a niveles similares y no presentaban un impacto negativo en los niveles agregados.

[0132]

Tabla 1 Condiciones de precipitación con PAA

PM de PAA	pH del flujo	Conductividad del flujo	PAA (%)	PAA (mol)	Anticuerpo 2H7 (mg/ml)	Anticuerpo 2H7 (mol)	Mol PVS/mol 2H7
1200	5	3,05	0,1	8,88E-05	3,46	2,53 E-06	35
1200	7	0,78	0,0125	5,82 E-05	0,66	2,52 E-06	23
8000	5	4,99	0,1	7,38 E-06	5,94	2,40 E-06	3
8000	7	1,53	0,0125	3,83 E-06	1,31	2,20 E-06	2

[0133]

Tabla 2 Resumen de los resultados de procesamiento cascada abajo

Poliectrolito	pH (-)	Etapas (-)	Rendimiento (%)	CHOP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Agregado (%)	Monómero (%)	Fragmento (%)
PAA PM 1200 (Da)	pH 5	ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
		Q	100	25(16)	3	0,64	99,13	0,23
		ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
	pH 7	PAA	82	117	<2	0,69	99,22	0,09
		Q	100	2,0	<2	0,55	99,38	0,07
		ProA	N/A	1098	5,0	0,63	99,14	0,24
PAA PM 8000 Da	pH 5	PAA	80	163	<2,2	0,73	99,18	0,09
		Q	99	1,7	<2,2	0,64	99,25	0,10
		ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
	pH 7	PAA	90	302	<2	0,80	99,05	0,15
		Q	103	2,6	<2	0,58	99,33	0,09
		ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
PVS PM 1800 Da	pH 7	PAA	90	390	<2	0,81	99,08	0,11
		Q	100	2,3	<2	0,65	99,25	0,10
		ProA	N/A	1105	23	0,80	98,92	0,27
		PVS	100	244	4,0	0,74	99,21	0,04
		Q	92	1,1	2	0,68	99,29	0,03

[0134] Purificación de anticuerpos anti-CD20

[0135] La precipitación con polielectrolitos se evaluó inicialmente como la sustitución por la etapa de cromatografía de intercambio catiónico. La función principal de la etapa de intercambio catiónico es reducir las impurezas de células huésped, eliminar la proteína arrastrada, gentamicina, ADN y reducir los agregados de anticuerpos, si están presentes (figura 11). La insulina se elimina mediante la etapa con proteína A previa. La etapa de precipitación con PVS redujo CHOP hasta niveles similares a la etapa de SPSFF. También redujo la proteína arrastrada y los fragmentos de anticuerpos. Hubo una reducción de gentamicina a lo largo de la etapa de precipitación, aunque no en el mismo grado que la etapa de SPSFF. El ensayo de ADN no funciona en presencia de PVS, de forma que no se pudo valorar la depuración con PVS a lo largo de la etapa de precipitación. La adición de la etapa de precipitación no incrementó los agregados de anticuerpos o afectó en la actividad biológica medida por la actividad de CDC (figura 11 y tabla 3).

[0136] A efectos de proporcionar una carga de alimentación más estimulante, se procesó el HCCF directamente a través de una columna de SPSFF. El flujo de SPSFF tenía CHOP 4 veces más que el flujo de proteína A cuando se utilizaba como etapa de captura inicial (figura 11). El % de fragmento también era superior que en el proceso de captura de proteína A (9,24% frente a 0,24%). Es probable que una proteasa copurificada con el anticuerpo a lo largo de la etapa de intercambio catiónico dé lugar a un recorte del anticuerpo. La etapa de precipitación con PVS redujo el fragmento en un 5,63%. Se redujo CHOP hasta 4,1 ng/mg a través del proceso, en comparación con los 71 ng/mg con una etapa de precipitación. La gentamicina también se redujo significativamente mediante la etapa de precipitación (de 146 a 8 ng/mg). La insulina y el ADN se redujeron hasta niveles bajos mediante la etapa inicial de captura de SPSFF, de manera que no se pudo valorar su depuración. El nivel elevado de fragmentos en la corrida del control (SPSFF-QSFF) dio lugar a una actividad de CDC reducida del 87% (Tabla 3). En cambio, la corrida de precipitado con PVS presentaba una actividad del 100% de CDC.

[0137] También se evaluó una etapa con PVS como una etapa de captura directa a partir de HCCF. La etapa de precipitación con PVS a pH 7 eliminó la insulina (figura 11). En cambio, la etapa de precipitación con PVS a pH 5 sólo redujo parcialmente los niveles de insulina. La precipitación con PVS a pH 7 redujo 3 veces más las proteínas de células huésped que con la precipitación a pH 5. La sustitución de la etapa de SPSFF final con un método de cromatografía ortogonal, tal como una etapa de interacción hidrofóbica, puede reducir además las impurezas de células huésped. Con la captura a pH 5, hubo un incremento del 4,66% en fragmentos de anticuerpos a lo largo de la etapa de intercambio catiónico. Esto no ocurrió con la etapa de captura a pH 7. Esto puede sugerir que a pH 5 (al igual que con la etapa de captura de SPSFF), se copurificó una proteasa ácida provocando el incremento en los fragmentos de anticuerpos. La adición de la etapa de precipitación no afectó a la actividad biológica medida por la actividad de CDC (Tabla 3). Se analizaron los flujos Q por la actividad biológica/potencia utilizando un ensayo de

citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Este ensayo se basa en la medición de la capacidad de rhuMab 2H7 de lisar células WIL2-S en presencia de complemento humano.

[0138]

5

Tabla 3 El efecto de precipitación con PVS en la actividad de CDC

Muestra	Actividad específica (%)	Desviación estándar (%)
Controles:		
HCCF-ProteínaA-SPSFF-QSFF	99	2
HCCF-ProteínaA-QSFF	102	2
HCCF-SPSFF-QSFF	87	10
Precipitación con PVS:		
HCCF-ProteínaA-PVS7-QSFF	101	5
HCCF-SPSFF-PVS7-QSFF	100	5
HCCF-PVS5-QSFF-SPSFF	96	5
HCCF-PVS7-QSFF-SPSFF	95	0

[0139] La depuración de polielectrolitos (eliminación de polielectrolito del anticuerpo resuspendido) se determinó utilizando un ensayo FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) en base a la inhibición de ARNasa A. El PVS es un potente inhibidor de ARNasa A. El ensayo utiliza un análogo de ARN con un marcador fluorescente en un extremo y un desactivador en el otro. Una vez el análogo de ARN se separa mediante la ARNasa A, el marcador fluorescente se libera del desactivador que produce emisión. La presencia de PVS inhibirá la actividad de ARNasa A, limitando la emisión fluorescente. A continuación se puede determinar la cantidad de PVS mediante la comparación con la fluorescencia observada de una muestra de prueba con una curva estándar. En todos los casos, se purificó el PVS hasta menos de 1 µg/ml en cromatografía QSFF (tabla 4).

[0140]

Tabla 4 Cuantificación de la depuración de PVS después de la precipitación del anticuerpo antiCD20 (2H7)

Muestra	Fluorescencia (RFU)	PVS (mg/ml)
Flujo Q de control	279	<1
(ProA-SP-Q)		
Cargas de Q con PVS (promedio)	40	606
Flujos Q		
ProA-PVS-Q	281	<1
HCCF-PVS 5-Q	290	<1
HCCF-PVS 7-Q	283	<1

[0141] Purificación de rhuMab DR5 Apomab

[0142] Se desarrolló un proceso de precipitación con polielectrolito y se aplicó a la purificación del anticuerpo rhuMab DR5 Apomab (pI 8,0, 150 kDa). Las proteínas del Receptor 5 que contiene el dominio de Muerte (DR5) son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (US 6872568; US 6743625). EL proceso de cromatografía estándar utiliza resinas Prosep vA, SPSFF y QSFF. El proceso de precipitación con polielectrolito se modificó para eliminar una impureza problemática de proteínas de células huésped, la glutatión-S-transferasa (GST). La etapa de Prosep vA presenta un lavado con TMAC 0,5 M, pH 5 a diferencia del lavado a pH 7 con fosfato de potasio 0,4 M. La etapa de lavado de SPSFF se eluye en un gradiente plano que produce un volumen de flujo de aproximadamente 12 volúmenes de columna. La precipitación con PVS se evaluó como la sustitución por la etapa de SPSFF. Se generaron curvas de solubilidad sobre un intervalo de pH de 5,5 a 7,0. Con el aumento del pH, se requería una dilución para reducir la fuerza iónica para conseguir la precipitación completa (figuras 12 y 13). En la figura 12, se requirió una dilución para reducir la fuerza iónica con el aumento del pH para conseguir la precipitación completa. A pH 5,5 y una conductividad de 5,1 mS/cm se observó una precipitación completa. Sin embargo, a pH 6 fue necesario diluir el flujo hasta 3 mS/cm para conseguir la precipitación completa. En la figura 13, se requirió una dilución para reducir la fuerza iónica con el aumento del pH para conseguir la precipitación completa. A pH 6,5, se observó una precipitación completa a 1,5 mS/cm. A pH 7, fue necesario diluir el flujo hasta 0,7 mS/cm para conseguir la precipitación completa.

[0143] Una vez se consiguió la precipitación completa, la adición de PVS adicional provocó que se redisoliera el precipitante. Este efecto se ilustra con las fotografías en la figura 14. La figura 14 ilustra el efecto de precipitación de PVS al 0,1% (p/v) en un matraz de Apomab en solución, y la redisolución a PVS al 1% (p/v). Las curvas de solubilidad se utilizaron para seleccionar las condiciones de precipitación indicadas en la tabla 5. La precipitación con PVS se realizó entre pH 5,5 y pH 7,0. Con el aumento del pH, hubo un ligero descenso en el rendimiento, pero

hubo una mejora en la depuración de CHOP y proteína a arrastrada (tabla 6). Restos flujos se procesaron posteriormente a través de una columna de QSFF y se compararon con las corridas de control (tabla 6). Una etapa de SPSFF o la etapa de precipitación con PVS eran necesarias para depurar CHOP hasta < 0,79 ng/mg y para depurar la proteína A arrastrada hasta < 2 ng/mg frente a 17 ng/mg de CHOP y 4 ng/mg de proteína A arrastrada en la corrida de control sin la etapa de SPSFF o precipitación. La precipitación con PVS también demostró la capacidad de reducir GST, pero no al mismo nivel que la etapa de SPSFF.

[0144]

Tabla 5 Condiciones de precipitación de Apomab

pH de flujo (-)	Conductividad del flujo (mS/cm)	PVS(%)	mol PVS/mol Ab
5,5	5,1	0,100	18
6,0	3,0	0,100	35
6,5	1,5	0,100	70
7,0	0,8	0,100	177

[0145]

Tabla 6 Purificación de ApoMab – Resultados del procesado cascada abajo para los flujos de intermedio de Apomab y los flujos de QSFF (b)

(a) Flujos intermedios	Flujo Pro A	Flujo SP	Flujo de PVS precipitado*				
			pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	
Rendimiento (%)	N/A	89	95	94	92	91	
CHOP (ng/mg)	507	24	223	212	173	121	
GST (ng/mg)	121	<180	<78	<79	<80	<81	
Proteína arrastrada (ng/mg)	8	<2	3	2	2	<2	
(b) Flujos Q	Flujo Pro A	Controles		Pro-A-PVS-Q			
		(PA-Q)	PA-SP-Q	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0
Rendimiento (%)	N/A	100	94	99	101	101	99
CHOP (ng/mg)	507	17(3)	<0,30	<0,74	<0,75	<0,77	<0,79
GST (ng/mg)	121	126	4	69	68	82	80
Proteína arrastrada (ng/mg)	8	4	<2	<2	<2	<2	<2

[0146] Purificación anti-cMet

[0147] Se generaron curvas de solubilidad para anti-cMet sobre un intervalo de pH y fuerzas iónicas seleccionadas debido a la disponibilidad limitada de material. Las curvas de solubilidad se generaron a partir del flujo de proteína A ajustado a pH 4 - pH 7 (Figura 15). Estas curvas se utilizaron para seleccionar el pH, la fuerza iónica y la concentración de PVS a la que se realizarían las precipitaciones a escala preparativa. A pH 5 y una conductividad de 2 mS/cm, el anti-cMet precipitó completamente de la solución a una proporción molar de PVS:Ab superior a 40 (figura 15). A pH 5, las curvas de solubilidad de se obtuvieron a conductividades de 1 mS/cm y 2,4 mS/cm. A una conductividad superior, anti-cMet no precipitaba completamente a partir de la solución. Al disminuir la conductividad de la solución hasta 1 mS/cm, el anti-cMet precipitaba más fácilmente a partir de la solución. A esta conductividad, tenía lugar la máxima precipitación a proporciones molares de PVS:Ab de 100. A proporciones molares superiores a 100, el complejo de polielectrolito presentaba una mayor solubilidad, probablemente debido a los efectos de repulsión carga-carga del polielectrolito. Una comparación de las curvas de solubilidad a pH 4 y pH 5, una conductividad de ~2 mS/cm, sugieren que los efectos de apantallamiento electrostático por contraiones en solución influyen en el pH al que tiene lugar la separación en fases del volumen y que una disminución en la fuerza iónica de la solución es necesaria con un pH incrementado. A pH 6 y pH 7 y conductividades de solución de 0,5 mS/cm, el anti-cMet no precipitaba completamente a partir de la solución en las concentraciones de PVS analizadas. Se obtuvo una precipitación máxima del 21% (C/Co = 0,79) y 12 % (C/Co = 0,88) a pH 6 y pH 7, respectivamente. La curva de solubilidad de anti-cMet a pH 6 y pH 7 es notablemente diferente en comparación con los anticuerpos humanizados de longitud completa con una pl de proteína similar, 8,3. Por ejemplo, utilizando condiciones similares, pH 7,0 y una

solución de conductividad 0,7 mS/cm, Apomab precipita completamente ($C/Co = 0$) con los mismos valores de R utilizados en estos experimentos.

[0148] Se comparó un proceso de purificación para anti-cMet (pl 8.3, 100 kDa) con precipitación con PVS con un proceso estándar utilizando cuatro etapas de cromatografía, una etapa de captura de proteína A, seguida de dos etapas de intercambio catiónico desarrolladas en modo de unión y elución y finalmente una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica operada en modo “flow through” (tabla 7). Ambas etapas de intercambio catiónico y la etapa de interacción hidrofóbica se sustituyeron con una precipitación con PVS seguido de la cromatografía de intercambio aniónico desarrollada en modo “flow through”. A pH 4, la reacción de precipitación se podía realizar a fuerzas iónicas más elevadas. Sin embargo, la precipitación a pH 5 puede producir más depuración de impurezas, ya que más impurezas de células huésped deben estar cargadas negativamente a este pH y, por tanto, permanecen en solución. Se seleccionaron las condiciones de pH 5,0, conductividad de 0,6 mS/cm y proporción molar de PVS de 100 (0,1% p/v) para maximizar la precipitación de anticuerpo determinada a partir de las curvas de solubilidad. El rendimiento de recuperación para la precipitación con PVS de anti-cMet estaba afectada por la solubilización de residuo PVS:anticuerpo. El residuo PVS:anticuerpo era del tipo de gel y difícil de solubilizar. Después de la solubilización del residuo en tampón de equilibrio de QSFF, la solución era turbida con partículas. La solución se filtró fácilmente utilizando un filtro de vacío de 0,4 μ M, produciendo una solución clara que se procesó sobre cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sefarosa.

[0149] La etapa de precipitación con PVS, realizada a pH 5, 0,5 mS/cm, y PVS al 0,1% (p/v), redujo ECP hasta niveles similares a la etapa de CM-Sepharose (Tabla 7). A través del proceso de precipitación, no se observó un descenso significativo en proteína A arrastrada o un incremento en el % de monómero.

[0150]

Tabla 7 Resumen de los resultados de procesamiento cascada abajo de anti-CMet

	Densidad de carga (mg/ml)	Rendimiento (%)	ECP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Monómero (%)
Proceso estándar					
Proteína A	10	95	2000	40	ND
CM Sepharose	30	85	500	7	ND
Poros 50 HS	40	93	300	<2	ND
Fenil Sepharose HS	50	73	150	<2	99
Proceso de precipitación					
Proteína A	10	95	3000	40	ND
Precipitación* con PVS	N/A	80	1988	N/D	ND
QSFF	40	95	666	38	93

[0151] Selección de las condiciones de filtración para la captura de precipitado

[0152] Los filtros de profundidad que tienen un medio de filtración adsorbente particularmente adecuados para la eliminación de contaminantes biológicos en el fluido de cultivo celular se pueden utilizar en los métodos de la invención. Los filtros de profundidad se utilizan habitualmente en la producción de productos biofarmacéuticos, derivados del cultivo de células de mamífero, con el objetivo de depurar varios fluidos de producto crudo. Los filtros de profundidad celulósicos, tales como los filtros MILLISTAK+® disponibles comercialmente en Millipore Corporation, tiene un lecho fijo poroso de material adsorbente, tal como un adsorbente granular, recubierto de un aglutinante termoplástico insoluble en agua. El filtro compuesto resultante permite una mayor cantidad de adsorbente con partículas adsorbentes más pequeñas que los filtros de profundidad convencionales. Estos filtros compuestos incluyen una capa de medio de profundidad celulósico estrechamente estructurado y se puede optimizar a una aplicación específica, tal como retener partículas coloidales y el residuo celular o retener las células completas y el residuo celular más grande. Combinan grados secuencias de medios, por ejemplo, mediante membranas apiladas, en un único cartucho de filtración. Dichos filtros de profundidad se pueden utilizar en procesos de refinamiento o depuración secundaria para eliminar pequeñas cantidades de materia suspendidas de las corrientes acuosas de producto (proteína). Los filtros también pueden proteger o extender la vida útil de los procesos de separación cascada abajo más caros, tales como filtración estéril y cromatografía de afinidad mediante la eliminación de contaminantes coloidales y otros residuos celulares. Además, dichos filtros de profundidad son también útiles para la protección de filtros de depuración viral mediante la eliminación de cantidades traza de proteínas aglomeradas.

[0153] Ciertos filtros de profundidad también pueden retener, en grados variantes, ciertos contaminantes solubles hallados normalmente en cultivos de células de mamífero, tales como ácidos nucleicos, proteínas de células

huésped, lípidos, tensoactivos, etc. Esta capacidad de retención para ciertos contaminantes solubles se basa en las propiedades de adsorción del medio de los filtros de profundidad. El medio de filtración utilizado habitualmente en los filtros de profundidad incluye fibras de células refinada (derivadas de pulpa de madera y/o algodón), tierras diatomeas, o aglutinantes de resina termoestables solubles en agua (US 2007/0193938). La tierra diatomea (una forma natural de sílice que contiene cantidades traza de varios silicatos) en estos compuestos es habitualmente del 40-60% en peso, adsorbiendo materia biológica de tamaño coloidal, tal como fragmentos celulares, orgánulos, y proteínas aglomeradas, así como varios productos bioquímicos solubles, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN).

[0154] La filtración de profundidad se evaluó como una etapa de captura para el precipitado de anticuerpos con PVS. La amplia distribución de tamaños del precipitado presenta un desafío para la captura del precipitado utilizando la filtración. Cada medio del filtro se analizó con anticuerpo precipitado bajo condiciones de filtración de flujo normal. Los medios de filtración de profundidad con tamaños de poro variantes se cribaron por su capacidad de capturar completamente el precipitado. El medio de filtración óptimo se seleccionó en base a su capacidad de capturar completamente el precipitado y también por su capacidad de cargarse hasta una capacidad elevada. Se utilizó $V_{\text{máx}}$ para evaluar la caída de presión a través del filtro, así como para determinar la máxima capacidad. La tabla 8 muestra el medio de filtración evaluado. La serie de MILLISTAK+® CE (solo celulosa) de medios evaluados incluían 20CE, 35CE y 45CE. La serie MILLISTAK+® HC (celulosa y ayuda inorgánica del filtro) de medios evaluados incluían C0HC, B1HC y A1HC (Rathore et al (1 Agosto 2004) BioPharm Intl.; US 2007/0193938). Los cartuchos y láminas de filtros MILLISTAK® están disponibles en Millipore Corp. (Bedford, MA).

[0155] Tal como se muestra en la figura 8, el medio 20CE media es más abierto en comparación con los medios 35CE y 45CE. El 20CE contiene un intervalo de tamaño de poro nominal de 5-10 micras, mientras que 35CE y 45CE contienen tamaño de poro nominales de 2-4 micras y 0,8-2 micras, respectivamente. Estas series de medios de filtración se seleccionaron para estrechar el intervalo de tamaños de poro que permiten la captura completa de precipitado de anticuerpo (variante de 2H7 humanizado)-PVS. El medio 20CE dio lugar a la captura del 45% de precipitado, mientras que 35CE dio lugar a la captura del 48% de precipitado. Por comparación, el 45CE dio lugar a la captura del 97% de precipitado. La serie Millistak+ HC de medios es más estrecha que la serie Millistak+ CE. El medio C0HC tiene un intervalo de tamaño de poro nominal de 0,2-2 micras, mientras que B1HC y A1HC tiene tamaños de poro más estrechos en el intervalo de 0,05-0,7 micras y 0,05-0,4 micras, respectivamente. Los tres dieron lugar a la captura del 99% de precipitado.

[0156]

Tabla 8

Medio de filtración	Intervalo de tamaño de poro nominal (μm)	% de captura de precipitado anticuerpo (2H7)-PVS
CE20	5,0 - 10	45%
CE35	2,0 - 4,0	48%
CE45	0,8 - 2,0	97%
C0HC	0,2 - 2,0	> 99%
B1HC	0,05 - 0,7	> 99%
A1HC	0,05 - 0,4	> 99%

[0157] La figura 34 muestra una representación del $V_{\text{máx}}$ de capacidad (medido en gramos de anticuerpos (2H7) por área de filtración) frente a la caída de presión para cada medio de filtración (Tabla 8). SE fijó un límite de presión de 17 psi para indicar el final del experimento debido a la obstrucción del filtro. Se fijó una capacidad objetivo de 125 g/m² para indicar el final del experimento en el caso de haber obstrucción del filtro. Ambos medios de filtración A1HC y B1HC alcanzaron 17 psi y de este modo proporcionaron la capacidad más baja. La capacidad al final de la filtración utilizando un medio A1HC fue de 40 g/m², mientras que la capacidad al final de la filtración utilizando un medio B1HC fue de 68 g/m². C0HC alcanzó la capacidad final de 125 g/m² con una presión máxima de 3,5 psi. Tal como se ha mencionado anteriormente, 20CE y 30CE retuvieron menos de un 50% del precipitado y, por tanto, no llegaron a la capacidad objetivo. 45CE alcanzó la capacidad objetivo con una presión máxima de 7 psi.

[0158] Selección de condiciones de resolubilización para la resolubilización del precipitado dentro de un filtro de profundidad

[0159] Se evaluaron diversos procedimientos de resolubilización para recuperar el anticuerpo capturado del filtro de profundidad. El objetivo de esta etapa era desarrollar un procedimiento robusto con una recuperación elevada de anticuerpo. El primer procedimiento evaluado fue la resolubilización de anticuerpo del precipitado utilizando un tampón de conductividad elevada a un pH elevado. Bajo condiciones de pH y conductividad elevados, el anticuerpo es menos positivo y más iones en solución protegen el PVS y, de este modo, el anticuerpo evita la precipitación. Se utilizó tampón de base Tris 50 mM/acetato sódico 50 mM en pH en el intervalo de 8-8,5 y conductividad de ~6 mS/cm para resolubilizar el anticuerpo. Se pasó el tampón a través del filtro de profundidad y el flujo resultante

contenía anticuerpo y PVS. Se evaluaron las variables como la velocidad de flujo y el volumen de tampón requeridas para resolubilizar completamente el anticuerpo. También se evaluó la recirculación de tampón a través del filtro de profundidad como un procedimiento de generación de un flujo más concentrado.

[0160] La Figura 35 muestra el efecto de variación de la velocidad de flujo en el rendimiento en términos de volumen de tampón necesario para alcanzar la resolubilización completa del precipitado de 2H7-proteína PVS-poliectrolito de los medios de filtro MILLISTAK +® C0HC. Los flujos en el intervalo de 52-130 LMH (litros por metro cuadrado por hora, una medida de la velocidad de flujo) y 130-261 LMH muestran una tendencia similar con ambas curvas dando lugar a rendimientos finales similares con 600 ml de tampón. La curva a un flujo de 130 LMH comprende la misma tendencia y también da lugar a un rendimiento similar con 600 ml de tampón. La variación de la velocidad de flujo no mejoraba la proporción de rendimiento con respecto al volumen de tampón. La mayor concentración de anticuerpo obtenida utilizando este procedimiento fue 1 g/L.

[0161] Se evaluó la recirculación del tampón a través del filtro de profundidad como un procedimiento que potencialmente podría dar lugar a un flujo más concentrado. Un reserva que contenía tampón sirvió como tampón de entrada y contenedor del flujo de salida. Tal y como se muestra en la Figura 36, se analizaron dos intervalos de flujo (flujo de tampón resolubilizante en LMH) para determinar el tiempo de procesamiento óptimo en el se recuperó la mayoría de la proteína del filtro como el precipitado de 2H7-proteína PVS-poliectrolito. Un flujo en el intervalo de 130-261 LMH alcanzó el mismo rendimiento del 84% que el flujo en el intervalo de 261-522 LMH después de 60 minutos. En términos de concentración de flujo, el proceso de recirculación dio lugar a un flujo más concentrado cuando se comparó con un paso único de tampón a través del filtro de profundidad. La mayor concentración de anticuerpo obtenida utilizando el proceso de recirculación fue de 2 g/L.

[0162] Realización de la reacción de precipitación y captura de la filtración de profundidad de modo continuo

[0163] La precipitación de PVS depende la interacción iónica entre la molécula de PVS fuertemente aniónica y las moléculas de anticuerpo sólo ligeramente catiónicas en solución. La dilución de las cargas de alimentación de proteínas para disminuir la conductividad de la solución hasta un rango aceptable para la precipitación de PVS puede causar grandes incrementos en el volumen de la carga de alimentación. Para evitar posibles restricciones de volumen a escala industrial, es necesario desarrollar un esquema para acondicionar la carga de alimentación en línea. Puede utilizarse la dilución en línea para disminuir la conductividad de una corriente de carga de alimentación sin requerir un depósito para la mezcla. Mediante la fusión de una corriente de PVS con la corriente de carga de alimentación acondicionada, la precipitación de PVS-anticuerpo puede suceder en línea y eliminar la necesidad de un gran depósito de precipitación a escala. La Figura 37 representa un esbozo de una disposición de acondicionamiento de HCCF/precipitación de PVS en línea los con objetivos de: (i) tiempo de residencia largo y velocidad de flujo baja para promover la agregación de partículas PVS-Mab; (ii) área transversal grande del reactor en línea para mantener un rendimiento del proceso elevado; y (iii) implementación a escala de laboratorio.

[0164] Aunque la precipitación de anticuerpo-PVS puede suceder fácilmente sobre la mezcla en línea de las corrientes de PVS y carga de alimentación acondicionada, el proceso de agregación de partículas de precipitado anticuerpo-PVS es muy sensible a la turbulencia de la corriente, tiempo de reposo, y velocidad de fluido lineal promedio. Se requiere un periodo de tiempo de reposo de baja agitación para la agregación de partículas de muestra requerida para formar partículas de precipitado lo suficientemente grandes para ser capturadas mediante los medios de filtración. Una velocidad de corriente elevada puede evitar que el precipitado de PVS-Ab forme agregados más grandes, creando una corriente de partículas de precipitado muy pequeñas que pueden ser difíciles de capturar mediante los medios de filtración.

[0165] Se proporciona una red de conductos de para el acondicionamiento de la carga de alimentación continua/precipitación de PVS en línea a escala de laboratorio conjuntamente con un procedimiento de captura de filtración de profundidad que procesa la corriente de la carga de alimentación continuamente precipitada. Se han observado rendimientos de recuperación de anticuerpo que van del 71% al 60% (Figura 38 para representaciones de rendimiento de anticuerpo) con el esquema del proceso mostrado en la Figura 37 con una depuración de CHOP de 9 veces sobre el paso de precipitación de PVS en línea.

[0166] Selección de las condiciones de precipitación de polielectrolito catiónico

[0167] Se generaron curvas de solubilidad utilizando dos pesos moleculares de poliarginina (poli-L-arginina) en CCF y HCCF. Las curvas de solubilidad son una representación de proteína residual restante en el sobrenadante después de la precipitación (expresada en porcentaje) frente a la concentración de polielectrolito expresada como el peso de polielectrolito (g)/volumen de solución (mL).

[0168] Se generaron curvas de solubilidad para CCF (Figura 20) y HCCF (normalmente a pH 7) con rhuMab 2H7 para un intervalo de fuerzas iónicas (Figura 21 y 22). Estas curvas se utilizaron para seleccionar las condiciones de precipitación óptimas de CHOP a las que se realizarían las precipitaciones a escala preparativa, concretamente la fuerza iónica, la concentración de poliarginina y el peso molecular. Se generaron también curvas de solubilidad con HCCF con anti-CD22 y rhuMab C2B8 HCCF (Figura 23 y 24) para asegurar la robustez y consistencia de la técnica

de precipitación. Para evaluar la viabilidad de la purificación de anticuerpos a través de dos etapas de precipitación, precipitación de polielectrolitos catiónicos seguido de precipitación de polielectrolitos aniónicos, se generaron curvas de solubilidad para la precipitación con PVS de HCCF con rhuMab generada a partir de la floculación de CCF con poliarginina 100 kDa al 0,075% p/v (figura 25). Con el aumento de la concentración de poliarginina, hubo precipitación de CHOP, tal como se indica por el descenso en la CHOP residual (ng/mg) en el sobrenadante. La precipitación de CHOP óptima apareció a una concentración de poliarginina de 0,2% p/v con una reducción de 22 veces en CHOP, con un 95% de rendimiento. Un mayor incremento en la concentración de poliarginina no dio lugar a una reducción significativa de CHOP, pero hubo un descenso en el rendimiento.

[0169] La precipitación de CHOP parece ser función de la fuerza iónica y el peso molecular del polielectrolito, tal como se observa en las curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7 (Figura 21 y 22). Con el descenso de la conductividad, hubo un incremento en la precipitación. En general, el aumento del peso molecular del polielectrolito parecía tener un impacto en la precipitación de CHOP. A concentraciones similares de poliarginina, un polielectrolito de peso molecular más elevado (110 kDa) precipitó más CHOP en comparación con el polielectrolito de peso molecular más elevado (42 kDa). A una conductividad particular (a excepción de 3mS/cm), la adición de poliarginina superior al 0,1 % p/v, no dio lugar a una reducción adicional significativa de CHOP. A una concentración de poliarginina del 0,1% p/v, se obtuvo una reducción de CHOP de 10 veces y 13 veces para los pesos moleculares de 42 kDa y 110 kDa, respectivamente, y los rendimientos fueron >95% para ambos pesos moleculares.

[0170] Se observaron tendencias similares con el HCCF con anti-CD22 y rhuMab C2B8, tal como se observa en las curvas de solubilidad de HCCF con rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 (Figura 23 y 24). La precipitación de HCCF con anti-CD22 con poliarginina de 100 kDa al 0,1% p/v dio lugar a una reducción de CHOP de 25 veces y un rendimiento del 95%. La precipitación de CHOP óptima para rhuMab C2B8 tuvo lugar a una concentración de poliarginina 110 kDa al 0,15% p/v, que dio lugar a una reducción de 20 veces en CHOP y un rendimiento del 95%.

[0171] Con el aumento de la concentración de PVS, hubo una precipitación completa de anticuerpo en la carga de alimentación floculada con poliarginina a los pH y conductividades analizados, indicada por el descenso en el rendimiento (%) (figura 25). Esto indica una interferencia mínima de la presencia de poliarginina en la precipitación con PVS del anticuerpo bajo las condiciones analizadas. A pH 7 y una conductividad de 1,5m S/cm, una vez se observó un nivel máximo de precipitación, la adición de PVS adicional causó que el precipitante se redisoliera.

[0172] Procesado cascada abajo de rhuMab 2H7

[0173] El proceso estándar actual utilizar tres etapas cromatográficas, una etapa de captura con proteína A seguido de una etapa de intercambio catiónico y aniónico. La floculación del CCF con poliarginina 110 kDa al 0,075% p/v y el procesamiento del HCCF con la precipitación de anticuerpo con PVS, seguido de la etapa de QSFF se muestran en el flujo de proceso a), tabla 9. La función principal de la etapa de floculación es depurar el CCF mediante la eliminación de sólidos (residuo celular), reduciendo así la turbidez, y precipitar las impurezas de células huésped, tales como CHOP y ADN. La poliarginina era capaz de flocular los sólidos y los componentes del medio de cultivo celular, y reducía la CHOP hasta 23480 ng/mg (reducción de 4 veces) y eliminó completamente el ADN. Si se incrementaba la concentración de poliarginina 110 kDa hasta 0,2% p/v, se obtenía una reducción de CHOP indicada por las curvas de solubilidad (figura 20) de hasta 22 veces. La precipitación con PVS de HCCF floculado reducía adicionalmente la CHOP hasta 212 ng/mg, que era significativamente menos que la CHOP en los flujos de HCCF-PSV de control. Los flujos de HCCF-PVS-Q de control tenían casi el doble de la cantidad de CHOP que los flujos de HCCF-PVS-Q con poli(Arg). El ensayo de ADN no funciona en presencia de PVS, de manera que no se puede evaluar la depuración de PVS a lo largo de la etapa de precipitación. El rendimiento a través de todas las etapas fue superior al 95% a excepción de las etapas de precipitación con PVS (tabla 9). Estos bajos rendimientos para las etapas de PVS se pueden atribuir al procedimiento de precipitación y a la manipulación a escala preparativa a diferencia de los mecanismos y condiciones de la precipitación (Figura 25). Para estos flujos no se evaluó el porcentaje de monómero, por SEC, insulina y gentamicina.

[0174] A efectos de estudiar el impacto en los procesos cascada abajo, se precipitó el HCCF con poliarginina 110 kDa al 0,1% p/v y se llevó a través de varios esquemas de purificación. El rendimiento para el anticuerpo fue para el 97% y se redujo la CHOP en 18 veces y el ADN se eliminó completamente mediante la precipitación con poliarginina. La insulina y la gentamicina no se depuraron mediante esta etapa de precipitación. Antes de procesar el HCCF precipitado cascada abajo, se generaron curvas de ruptura para evaluar el impacto de la poliarginina en la capacidad de carga de la resina de SPSFF. Para ambas cargas, el HCCF precipitado con poliarginina y el flujo de proteína A después de la precipitación, la ruptura en SPSFF tuvo lugar a 60 mg de anticuerpo por ml de resina similar al control (sin precipitación con poliarginina). Esto indica que la poliarginina no afectaba negativamente en la capacidad de unión de SPSFF (figuras 26 y 27)

[0175] Proceso de anticuerpos estándar (flujo de proceso b), tabla 9): Se procesó el HCCF precipitado con poliarginina a través de proteína A seguido de una cromatografía de intercambio iónico. El flujo de poliarginina-proteína A tenía niveles de CHOP similares a la proteína A de control, aunque los niveles de CHOP en la alimentación de carga eran muy diferentes. La gentamicina y la insulina se redujeron hasta niveles bajos mediante de una etapa de proteína A. La CHOP se redujo 490 veces hasta 3 ng/mg sobre la SPSFF en comparación con 307

ng/mg en ausencia de la etapa de precipitación. El ADN, la proteína A arrastrada, la insulina y gentamicina también se redujeron hasta niveles aceptables mediante el proceso de poliarginina-proteína A-SP comparable con el proceso de control (Proteína A-SPSFF-QSFF) (Tabla 9). Dado que los niveles de impureza son aceptables en los flujos de SPSFF después de la precipitación con poliarginina, no es necesario procesarlos sobre QSFF.

[0176] Proceso de purificación de anticuerpos sin afinidad (flujo de proceso c), tabla 9): Se procesó el HCCF precipitado con poliarginina a través de SPSFF seguido de QSFF. El flujo de SPSFF después de la precipitación tenía 63 ng/mg de CHOP (una reducción de 76 veces) en comparación con 6731 ng/mg en ausencia de precipitación. SPSFF eliminó completamente la insulina y redujo parcialmente la gentamicina. La depuración de CHOP fue mejor en el proceso de poliarginina-SP, mientras que la depuración de ADN, insulina y gentamicina era comparable con el proceso de control (SPSFF-QSFF) (figura 28). Después de la precipitación con poliarginina, los niveles de CHOP en el flujo de SPSFF son similares al flujo de QSFF, sugiriendo que la etapa de QSFF es redundante en este proceso.

[0177] Proceso de purificación por precipitación/cromatografía de dos etapas

[0178] Al HCCF precipitado con poliarginina le siguió la precipitación de anticuerpos mediante PVS y a continuación se procesó sobre QSFF (flujo de proceso d, tabla 9). El flujo de PVS tenía 49 ng/mg de CHOP (una reducción de 99 veces) en comparación con 1517 ng/mg en ausencia de precipitación con poliarginina. La etapa de precipitación con PVS eliminó completamente la insulina y redujo parcialmente gentamicina. La depuración de CHOP fue mejor en el proceso de poliarginina-PVS, mientras que la depuración de ADN e insulina era comparable con el proceso de control (SPSFF-QSFF). La depuración de gentamicina fue 2 veces menos que en el proceso de control, en presencia de una etapa de QSFF. Después de la precipitación con poliarginina, los niveles de CHOP en el flujo de SPSFF son similares al flujo de QSFF, sugiriendo que la etapa de QSFF es redundante en este proceso.

[0179]

Tabla 9. Resumen de los resultados de procesado cascada abajo para rhuMab 2H7

	Rendimiento (%)	CHOP (ng/mg)	SEC (% monómero)	Proteína A (ng/mg)	ADN (pg/mg)	Insulina (ng/mg)	Gentamicina (ng/mg)
a) HCCF de control	NA	93191	ND	NA	914893	ND	ND
CCF recogido y floculado con poli(Arg)	97	23480	ND	NA	<0,4	ND	ND
HCCF-PVS control	80	900	ND	NA	ND	ND	ND
CCF – PVS recogido y floculado con poli(Arg)	75	212	ND	NA	ND	ND	ND
HCCF-PVS-Q* control	100	90	ND	NA	ND	ND	ND
CCF – PVS-Q* recogido y floculado con poli(Arg)	100	54	ND	NA	ND	ND	ND
b) HCCF	NA	86331	NA	NA	373247	1,70	20500
Poli(Arg) HCCF	90	4836	NA	NA	<0,3	<1,93	22100
HCCF-Pro A	99	1689	98,1	9,3	52	<0,01	33,9

Poli(Arg) HCCF- ProA	103	1447	97,5	16,7	<0,3	0,16	24,4
HCCF- ProA-SP	100	307	98,4	<2	<0,2	<0,02	1,2
Poli(Arg) HCCF- Pro A- SP	92	3	98,5	<2	<0,1	<0,02	0,6
HCCF- Pro A- SP-Q	87	<2,8	97,9	<2	<0,2	<0,05	1,2
Poli(Arg) HCCF- Pro A- SP-Q	93	<2,6	98,8	<2	<0,2	<0,05	0,7
c) HCCF- SP	99	6731	97,6	<2	0,7	<0,02	99,9
Poli(Arg) HCCF- SP	88	63	98,8	<2	<0,2	<0,02	84,3
HCCF- SP-Q	93	81	97,6	<2	<0,2	<0,06	92,9
Poli(Arg) HCCF- SP-Q	99	46	98,3	<2	<0,2	<0,05	81,1
d) HCCF- PVS	70	1517	97,0	V	ND	<0,03	1030
Poli(Arg) HCCF- PVS	73	49	98,5	<2	ND	<0,03	1000
HCCF- PVS-Q*	97	79	97,2	<2	ND	<0,02	504
Poli(Arg) HCCF- PVS-Q*	98	34	98,6	<2	ND	<0,02	691
*Q cargado hasta 30 g/L: ND – No determinado; NA – No aplicable							

[0180] Inhibición de la reducción de anticuerpos

- 5 **[0181]** El HCCF que contiene rhuMAb 2H7 se trató con poliarginina y se mantuvo en minilatas de acero inoxidable durante 48 horas y se tomaron muestras a puntos de tiempo regulares y se analizaron. El anticuerpo estaba intacto y no se redujo durante el periodo de tiempo completo en el HCCF precipitado con poliarginina a diferencia del control, donde el anticuerpo empieza a reducirse a las 10 horas (figura 28). La poliarginina inhibe los agentes reductores de anticuerpos mediante su precipitación junto con otras impurezas cargadas negativamente.

10 **[0182] Evaluación de otros polielectrolitos catiónicos**

- 15 **[0183]** La optimización de las condiciones de precipitación para aumentar adicionalmente la eliminación de impurezas puede incluir la utilización de otros polielectrolitos, así como la optimización de otras condiciones, tales como la velocidad y el tipo de agitación, y la velocidad de adición del polielectrolito. Se seleccionó otro poli(aminoácido) básico, polilisina, para una comparación inicial con la poliarginina. La poliarginina tiene un grupo funcional de catión guanidinio que le da un pKa de aproximadamente 12,5. La polilisina tiene un catión amina como grupo funcional que le da un pKa de aproximadamente 10,5. Tanto la poliarginina como la polilisina están disponibles comercialmente en múltiples pesos moleculares.

20 **[0184] Curva de solubilidad del flujo de proteína a con rhuMAb C2B8**

- [0185]** La precipitación de CHOP por el polielectrolito polication cargado positivamente se correlaciona con la fuerza iónica y el peso molecular del polielectrolito (Figuras 29 y 30). La polilisina de peso molecular inferior (2,5 kDa) no precipitaba CHOP en el intervalo de conductividad de 3-12 mS/cm. Sin embargo, la polilisina de 50kDa daba lugar a

reducciones de CHOP de 4 veces y 2 veces a 3 mS/cm y 6mS/cm, respectivamente. No se observó una precipitación de CHOP significativa a 12 mS/cm. En general, con el descenso de la conductividad, hubo un incremento en la precipitación de CHOP y el aumento del peso molecular del polielectrolito parecía tener un impacto en la precipitación de CHOP. A conductividades inferiores, una vez se obtuvo la precipitación máxima de CHOP, la adición adicional de polilisina dio lugar a la resolubilización del precipitado. Los rendimientos fueron mayores del 95% para todas las condiciones analizadas.

[0186] Curva de solubilidad del flujo de HCCF con rhuMab C2B8

[0187] Se observaron tendencias similares con HCCF de rhuMab C2B8 (Figura 31 y 32). A conductividades de 3 mS/cm y 6 mS/cm, ambas polilisinas de 50 kDa y 225 kDa dieron lugar a una reducción de CHOP en 9 veces. Sin embargo, no se obtuvo una reducción significativa de CHOP a 12 mS/cm, incluso con polilisina de 225 kDa. Esto indica que la precipitación de CHOP a conductividades elevadas requiere un polielectrolito altamente cargado, como poliarginina, para superar la interferencia iónica. Los rendimientos fueron superiores al 90% para todas las condiciones analizadas.

[0188] Se generaron curvas de solubilidad para tres anticuerpos (rhuMab 2H7, anti-CD22 y rhuMab C2B8) utilizando poliarginina (Figuras 20-25, 29-32). La precipitación de CHOP era función del pKa, peso molecular y concentración de polielectrolito, así como la fuerza iónica de la solución. Las propiedades de los anticuerpos, tales como la densidad de carga y el punto isoeléctrico también pueden jugar un papel en la separación de impurezas de los anticuerpos. Las impurezas, tales como CHOP y ADN, se eliminan manipulando la concentración de polielectrolito y la fuerza iónica. Se pueden variar las propiedades de polielectrolito, tales como el grupo funcional, el peso molecular, la densidad de carga y la hidrofobicidad. Se puede utilizar poliarginina como floculante en CCF o como precipitante de impurezas en HCCF. La precipitación depende de la conductividad. Se obtuvo una eliminación de CHOP de 10-25 veces y el ADN era indetectable (tabla 9). La poliarginina no tuvo un impacto negativo en la capacidad de unión de la SPSFF y es compatible con la precipitación de anticuerpos con polielectrolitos aniónicos y resinas de intercambio catiónico. La adición de poliarginina a HCCF también tiene ventajas adicionales sorprendentes e inesperadas, incluyendo la inhibición de la reducción de anticuerpo, posiblemente mediante la precipitación del agente reductor junto con otras impurezas.

[0189] EJEMPLOS

[0190] A efectos de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos no limitan la invención y sólo sugieren métodos para llevar a la práctica de la invención. Los expertos en la materia entenderán que los métodos, protocolos, procesos, reactivos y aparatos de ejemplo descritos se pueden adaptar fácilmente a los métodos alternativos prácticos de esta invención y se estima que están dentro del alcance de la invención

[0191] Ejemplo 1 Cromatografía de proteína A

[0192] La columna de proteína A utilizó resina de Prosep vA y se utilizó para purificar rhuMab 2H7 presente en el HCCF. El diámetro de columna fue de 2,5 cm y la altura del lecho fue de 14 cm. La columna trabajó a una velocidad de flujo de 40 CV/h (volúmenes de columna por hora). La columna de Prosep vA se desarrolló en múltiples ciclos (2 ciclos). Después del equilibrio, se aplicó HCCF a la columna y se retuvo el rhuMab 2H7 en la columna. A continuación, se lavó la columna con tampón de equilibrio, seguido de tampón de lavado y a continuación de nuevo mediante tampón de equilibrio. Después de completar estos lavados, se aplicó el tampón de elución a la columna. La acción del flujo se inició en base a la absorbancia a 280 nm (DO 0,5) y se terminó después de 2 volúmenes de columna. Posteriormente se aplicó a la columna el tampón de regeneración. La composición del tampón y las duraciones de las fases se indican en la tabla 10.

[0193]

Tabla 10 Composición del tampón de Prosep vA y duraciones de las fases

Tampón	Componente del tampón	Duración de la fase (CV)
Tampón de equilibrio	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1	5
Carga	rhuMab 2H7 HCCF	hasta una capacidad de 14 g/L
Tampón de Lavado 1	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1	3
Tampón de Lavado 2	fosfato de potasio 0,4 M pH 7,0	4
Tampón de Lavado 3	Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1	3
Tampón de Elución	ácido acético 0,1 M pH 2,9	4
Tampón de regeneración	ácido fosfórico 0,1 M	3
Solución de Almacenamiento	acetato 0,1 M, alcohol bencílico al 2% pH 5,0	5 (sólo el último ciclo)

5

[0194] El fluido de cultivo celular recogido (HCCF) derivado de las células huésped recombinantes se puede cargar en la fase sólida de equilibrio utilizando un tampón de carga que pueden ser el mismo que el tampón de equilibrio. A medida que el preparado fluye a través de la fase sólida, la proteína se adsorbe a la proteína A inmovilizada y otros contaminantes (tales como Proteínas de Ovario de Hámster Chino, CHOP, donde la proteína se produce en una célula CHO) se pueden unir de manera no específica a la fase sólida. La siguiente etapa realizada secuencialmente comprende eliminar los contaminantes unidos a la fase sólida, anticuerpo y/o proteína A, mediante el lavado de la fase sólida en una etapa de lavado intermedio. Después de cargar, la fase sólida se puede equilibrar con tampón de equilibrio antes de empezar la etapa de lavado intermedia. El tampón de lavado intermedio puede comprender sal y un compuesto adicional, donde el compuesto adicional es (a) detergente, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80; (b) disolvente (por ejemplo, hexilenglicol); y (c) polímero (por ejemplo, PEG). La sal utilizada se puede seleccionar en base a la proteína de interés, pero preferiblemente es acetato (por ejemplo, acetato de sodio). Las cantidades de sal y compuesto adicional en la composición son tales que la cantidad combinada eluye el contaminante o contaminantes, sin eliminar sustancialmente la proteína de interés. Las concentraciones de sal en dichos tampones de lavado pueden variar desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 M, o desde aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,6 M. Las concentraciones útiles de detergente son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0,1 a 1%, o aproximadamente 0,5%, por ejemplo, donde el detergente es polisorbato. Las concentraciones de solvente de ejemplo son de aproximadamente 1% a 40%, o aproximadamente 5 a aproximadamente 25%. Cuando el compuesto adicional es un polímero (por ejemplo, PEG 400 o PEG 8000), la concentración del mismo puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente desde aproximadamente 5% a aproximadamente 15%.

[0195] En otra realización, la etapa de lavado intermedio implica la utilización de una solución de tampón altamente concentrado, por ejemplo, un tampón a una concentración superior a aproximadamente 0,8 M, por ejemplo, hasta aproximadamente 2 M, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,8 M a aproximadamente 1,5 M, lo más preferible aproximadamente 1 M. En esta realización, el tampón es preferiblemente un tampón Tris, tal como acetato de Tris. El pH del tampón de lavado intermedio puede ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, o aproximadamente 5,0. En otra realización, el pH es aproximadamente 7,0. Después de la etapa de lavado intermedio del párrafo anterior, la proteína de interés se recupera de la columna. Esto se consigue normalmente utilizando un tampón de elución adecuada. La proteína se puede eluir, por ejemplo, de la columna utilizando un tampón de elución que tiene un pH bajo, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5. Ejemplos de tampones de elución para este objetivo incluyen tampones de citrato o acetato. Durante la fase de elución de la operación con proteína A, cualquier CHOP no unida específicamente se puede coeluir con la proteína de interés, comprometiendo la pureza del flujo de producto. Para eliminar la CHOP antes de la fase de elución, se puede realizar una etapa de lavado intermedio de ejemplo utilizando cloruro de tetrametilamonio (TMAC) para eliminar CHOP (US 6870034; US 6127526; US 6333398).

[0196] Ejemplo 2 Cromatografía de SPSFF

[0197] La columna de intercambio catiónico utilizó una resina de SP Sepharose Fast Flow (SPSFF) en modo de unión y elución con una elución en gradiente. La columna de SPSFF trabajó a una velocidad de flujo de 150cm/h. En todos los casos, la altura del lecho fue de 30 cm. Cuando se procesaban flujos intermedios de la cromatografía (flujos de Prosep vA y QSFF), se utilizó una columna de diámetro interno de 0.66 cm y la columna se cargó hasta 40 g/L. Cuando se procesaba HCCF, se utilizó una columna de diámetro de 0,6-2,2 cm y la columna se cargó 10-40 g/L.

g/L. en todos los casos, la carga se acondicionó a pH 5,0 y una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm. Después de la carga, la columna se lavó a continuación con tampón de equilibrio seguido de tampón de lavado y a continuación de nuevo mediante tampón de equilibrio. Después de completar los lavados, se eluyó el rhuMab 2H7 en un gradiente desde acetato 50 mM hasta acetato 350 mM sobre unos 15 volúmenes de columna. La acción del flujo se inició y terminó en base a la absorbancia a 280 nm (DO 0,5). La columna se regeneró y se sanitizó con hidróxido de sodio 0,5 N y se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N. La composición de tampón y las duraciones de las fases se indican en la tabla 11.

[0198]

Tabla 11 Composición del tampón de SPSFF y duraciones de las fases

Etapas	Tampón	CV
Equilibrio	Acetato de sodio 50 mM pH 5,5	5
Lavado 1	Acetato de sodio 50 mM pH 5,5	3
Lavado 2	MOPS 25 mM pH 7,1	5
Lavado 3	Acetato de sodio 50 mM pH 5,5	3
Elución	A: Acetato de sodio 50 mM pH 5,5 B: Acetato de sodio 350 mM pH 5,5	15
Sanitización	NaOH 0,5M	4
Almacenamiento	NaOH 0,1 M	3

[0199] Ejemplo 3 Cromatografía de intercambio aniónico

[0200] La columna de intercambio aniónico utilizó una resina Q Sepharose Fast Flow (QSFF) y trabajó en modo de "flow-through". La columna QSFF trabajó a una velocidad de flujo de 150 cm/h. El diámetro de columna fue de 0,66 cm y la altura del lecho de 20 cm. La columna se equilibró y cargó a pH 8,0. El anticuerpo rhuMab 2H7 fluyó a través de la columna, que a continuación se lavó con tampón de equilibrio. La acción del flujo se inició y terminó en base a la absorbancia a 280 nm (DO 0,5). La columna se regeneró y se sanitizó con hidróxido de sodio 0,5 N y se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N. La composición de tampón y las duraciones de las fases se indican en la tabla 12.

[0201]

Tabla 12 Composición del tampón de QSFF y duraciones de las fases

Etapas	Tampón	CV
Equilibrio	Tris 50 mM, acetato 50 mM, pH 8,0	8
Carga	flujo acondicionado de la etapa previa	hasta una capacidad de 40g/L
Lavado 1	Tris 50 mM, acetato 50 mM, pH 8,0	5
Sanitización	NaOH 0,5M	4
Almacenamiento	NaOH 0,1M	3

[0202] Ejemplo 4a Purificación con polielectrolitos aniónicos

[0203] Los flujos de anticuerpo se ajustaron al pH y conductividades indicados en la tabla 13. Se ajustó el HCCF a pH 6 con ácido acético 1 M y la conductividad a 2,0 mS/cm con WFI (agua para irrigación). Se añadió PVS en línea al HCCF acondicionado hasta alcanzar una concentración final de 0,05% p/v durante un periodo de 20 minutos. Mientras se mezclan, se añadió PVS al flujo condicionado hasta las concentraciones finales indicadas en la tabla 13. El flujo precipitado con PVS se centrifugó a 4000 rpm (4657 g) a 10°C durante 30 minutos utilizando una centrífuga Sorval R3-CB. Se extrajo el sobrenadante y se lavó el residuo celular con MOPS 25 mM, pH 7,1. El residuo se resuspendió en Tris 50 mM, acetato 50 mM y pH 8,0 (aproximadamente 6,5 mS/cm). El residuo resuspendido se procesó posteriormente a través de una cromatografía QSFF.

[0204] Ejemplo 4b Purificación con polielectrolito catiónico

[0205] Precipitación del fluido de cultivo celular (CCF): se realizó la precipitación de impurezas con poliarginina, peso molecular 110 kDa. La poliarginina se añadió a CCF en un biorreactor durante un periodo de 5 minutos hasta alcanzar una concentración final de 0,075% p/v, mezclando a 100 rpm. A continuación, el CCF floculado se centrifugó a 1000 g y se filtró de forma estéril a través de un filtro de 0,2 µm

[0206] Precipitación del fluido de cultivo celular recogido (HCCF): Se añadió poliarginina (poli-L-arginico) a HCCF en un biorreactor durante un periodo de 5 minutos hasta alcanzar una concentración final de 0,1% p/v, mezclando a 100 rpm. A continuación, el HCCF precipitado se centrifugó a 5000 g y se filtró de forma estéril a través de un filtro de 0,2 µm. La carga de alimentación filtrada se procesó a través de diferentes procesos de purificación.

[0207]

Tabla 13 Condiciones de precipitación con PVS para 2H7

Corrida	PH flujo (-)	Conductividad flujo (mS/cm)	PVS (%)	PVS (M)	Anticuerpo (mg/ml)	Anticuerpo (M)	Mol PVS/mol Ab
HCCF-Pro A-PVS-QSFF	7	0,74	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,67	$4,46 \times 10^{-9}$	15,57
HCCF-Sp-PVS-QSFF	7	0,76	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,13	$8,67 \times 10^{-10}$	80,13
HCCF-PVS-QSFF-SPSFF	5	3,05	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,19	$1,24 \times 10^{-9}$	56,09
HCCF-PVS-QSFF-SPSFF	7	0,68	0,0031	$1,74 \times 10^{-8}$	0,04	$2,74 \times 10^{-10}$	63,44

5

[0208] Ejemplo 5 Determinación de la concentración de proteína:

[0209] Se determinó la concentración de anticuerpos en los flujos mediante la absorbancia a 280 nm (restando la absorbancia a 320 nm para corregir la dispersión de la luz), utilizando un espectrofotómetro 8453 con una celda de flujo de longitud de paso de 10 mm (Agilent). Se utilizó un coeficiente de extinción de 1,75 ml/(mg cm). Se calculó la concentración de anticuerpo utilizando la siguiente ecuación:

10

$$\text{mg/mL} = \frac{A_{280} - A_{320}}{1,75} \times \text{factor de dilución}$$

15

[0210] Ejemplo 6 Cromatografía de exclusión por tamaño

[0211] Se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño para controlar la heterogeneidad del tamaño de rhuMAb 2H7 bajo condiciones nativas. El ensayo utilizó una columna TSK-GEL G3000SWXL (7,8 mm x 300 mm, Tosohaas) para separar los agregados, monómero y fragmentos. La columna se utilizó a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min utilizando un tampón para corrida a pH 6,2 de fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M. La columna se operó a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron en tampón para corrida y se inyectaron 20 µg para cada muestra. Se utilizó la absorbancia a 280 nm para controlar los niveles de agregados, monómero y fragmentos.

20

25

[0212] Ejemplo 7 ELISA de CHOP- Y:42

[0213] Se utilizó un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) que utiliza anticuerpos anti-CHOP de cabra para determinar las concentraciones de CHOP en todos los flujos. Para el ELISA, se inmovilizaron anticuerpos anti-CHOP de cabra purificados por afinidad en pocillos de placas de microtitulación. Las diluciones de las muestras de los flujos se incubaron en los pocillos, seguido de la incubación con anticuerpos anti-CHOP de cabra conjugados a peroxidasa. La actividad enzimática de peroxidasa de rábano se cuantificó con o-fenilendiamina que produce una señal colorimétrica. Las muestras se diluyeron en serie en un diluyente de ensayo, de manera que la lectura de la absorbancia se encontraba en el intervalo del ensayo (5-320 ng/ml).

30

35

[0214] Ejemplo 8 ELISA de Proteína A - Y:80

[0215] Se determinó el nivel de proteína A mediante un ELISA de sándwich de proteína A. Se inmovilizaron anticuerpos anti-proteína A de estafilococos de pollo en pocillos de placa de microtitulación. Se diluyeron las muestras hasta anticuerpo 0,2 mg/ml y se aplicaron a los pocillos. La proteína A, si está presente en la muestra, se unió al anticuerpo de recubrimiento. La proteína A unida se detectó con anticuerpos anti-proteína conjugados a peroxidasa de rábano. La actividad enzimática de peroxidasa de rábano se cuantificó con o-fenilendiamina que produce una señal colorimétrica.

40

45

[0216] Ejemplo 9. ELISA de insulina - Y:64

[0217] Se utilizó un ELISA con anticuerpos policlonales anti-insulina de cobaya para determinar concentraciones de insulina en todos los flujos. Para el ELISA, se inmovilizaron anticuerpos anti-insulina purificados por afinidad en pocillos de placas de microtitulación. Se incubaron diluciones de las muestras agrupadas en los pocillos, seguido de la incubación con anticuerpos anti-insulina de cobaya conjugados a peroxidasa. Se cuantificó la actividad enzimática de peroxidasa de rábano con tetrametil bencidina. Las muestras se diluyeron en serie en diluyente de ensayo, de manera que la lectura de absorbancia se encontraba en el intervalo del ensayo (0,094-3,000 ng/mL).

50

[0218] Ejemplo 10. ELISA de Gentamicina - Y: 81

[0219] Se utilizó un ELISA competitivo para determinar las concentraciones de gentamicinas en todos los flujos. Se inmovilizaron los anticuerpos policlonales de cabra a gentamicina-BSA en pocillos de placas de microtitulación. La gentamicina competía con gentamicina biotinilada para la unión a los anticuerpos. La cantidad de gentamicina marcada con biotina se detectó con la adición de peroxidasa de rábano-estreptavidina y sustrato de o-fenilendiamina. Las muestras se diluyeron en serie en diluyente de ensayo, de manera que la lectura de absorbancia se encontraba en el intervalo del ensayo (0,37-90 ng/ml).

[0220] Ejemplo 11. Ensayo por PCR de ADN de CHO - Y:77

[0221] Se cuantificó el ADN mediante amplificación por PCR de ADN de CHO. El ADN de las muestras y los controles se extrajeron en primer lugar utilizando el kit Mini de ARN viral de Qiagen. Los extractos y la curva estándar, junto con la mezcla madre de PCR que contenía los cebadores y la sonda, se cargaron a continuación en un formato de placas de 96 pocillos en un sistema de detección de secuencias comercial (Applied Biosystems), donde se cuantificó el ADN de CHO utilizando PCR a tiempo real. El PCR TaqMan® utiliza cebadores y sonda que se diseñan específicamente para la secuencia de ADN de CHO diana. Se midió la amplificación del producto utilizando una sonda fluorogénica, marcada con un colorante informador en el extremo 5', que se suprime por un colorante desactivador en el extremo 3'. La Taq polimerasa empieza la amplificación del ADN diana y tras alcanzar la sonda, su actividad de 5' nucleasa desplaza la sonda, liberando el colorante informador. Cuando el colorante informador ya no está próximo al colorante desactivador, el reportero emite fluorescencia y se mide el incremento en la intensidad de emisión. Se calculan los números de ciclos en los que el ADN se ha amplificado más allá del umbral (Ct) para la curva estándar, contra la cual se cuantifican concentración de muestra desconocidas.

[0222] Ejemplo 12. Potencia de rhuMAb 2H7

[0223] Se determinó la potencia de rhuMAb 2H7 utilizando un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Este ensayo se basa en la medición de la capacidad de rhuMAb 2H7 para lisar células WIL2-S en presencia de complemento humano.

[0224] Ejemplo 13. Ensayo de inhibición de ARNasa A por PVS

[0225] El PVS es un potente inhibidor de ARNasa A. El ensayo utiliza un análogo de ARN con un marcador fluorescente en un extremo y un desactivador en el otro. Una vez se separa el análogo de ARN por la ARNasa A, el marcador fluorescente se libera del desactivador, produciendo la emisión. La presencia de PVS inhibirá la actividad de ARNasa A, limitando la emisión fluorescente. La cantidad de PVS se puede entonces determinar mediante la comparación de la fluorescencia observada a partir de una muestra de prueba con una curva estándar.

[0226] Las palabras "comprende" "que comprende", "incluyen", "que incluye" e "incluye", cuando se utilizan en esta memoria y en las siguientes reivindicaciones, pretenden especificar la presencia de características, números enteros, componentes o etapas indicadas, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, componentes, etapas o grupos de los mismos,.

REIVINDICACIONES

1. Método de purificación de anticuerpos que comprende:

- 5 (a) ajustar la acidez o concentración de sal de una mezcla que contiene un anticuerpo donde el anticuerpo deriva de un fluido de cultivo celular recogido y el fluido de cultivo celular recogido deriva de un cultivo de células de mamífero;
 - (b) añadir un polielectrolito cargado negativamente seleccionado entre ácido polivinilsulfónico, polivinilsulfonato, ácido poliestirensulfónico, y ácido poliacrílico y donde el polielectrolito cargado negativamente tiene un peso
10 molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1.000.000 Da, mediante lo cual se forma un precipitado de proteína-polielectrolito que comprende el polielectrolito cargado negativamente y el anticuerpo;
 - (c) separar el precipitado de proteína-polielectrolito de impurezas seleccionadas entre agregados de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de células huésped, insulina, gentamicina, ADN, y proteína A arrastrada;
15 (d) aislar el precipitado de proteína-polielectrolito; y
 - (e) resuspender el precipitado de proteína-polielectrolito en una solución acuosa.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona entre un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión, en el que el anticuerpo se selecciona opcionalmente entre un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-DR5, y un anticuerpo anti-CMET.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo deriva del fluido de cultivo celular recogido mediante la inmovilización del anticuerpo en un adsorbente de proteína A.
4. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo deriva del cultivo celular recogido mediante cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 5. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se captura directamente del fluido de cultivo celular recogido.
6. Método según la reivindicación 1, en el que se añade a la mezcla más de un polielectrolito cargado negativamente.
35 7. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración de polielectrolito cargado negativamente está entre 0,01% y 1,0% en peso/volumen en la mezcla que contiene la proteína.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precipitado de proteína-polielectrolito se
40 aísla mediante centrifugación.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precipitado de proteína-polielectrolito se aísla mediante filtración.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que el precipitado de proteína-polielectrolito se aísla mediante filtración profunda.
11. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína se resolubiliza con un paso único del tampón de resolubilización a través del filtro.
50 12. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína se resuspende mediante la recirculación del tampón de resolubilización a través del filtro.
13. Método según la reivindicación 1, en el que el polielectrolito se separa del precipitado de proteína-polielectrolito resuspendido mediante purificación de intercambio aniónico.
55 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo de células de mamífero es un cultivo de células de ovario de hámster chino.

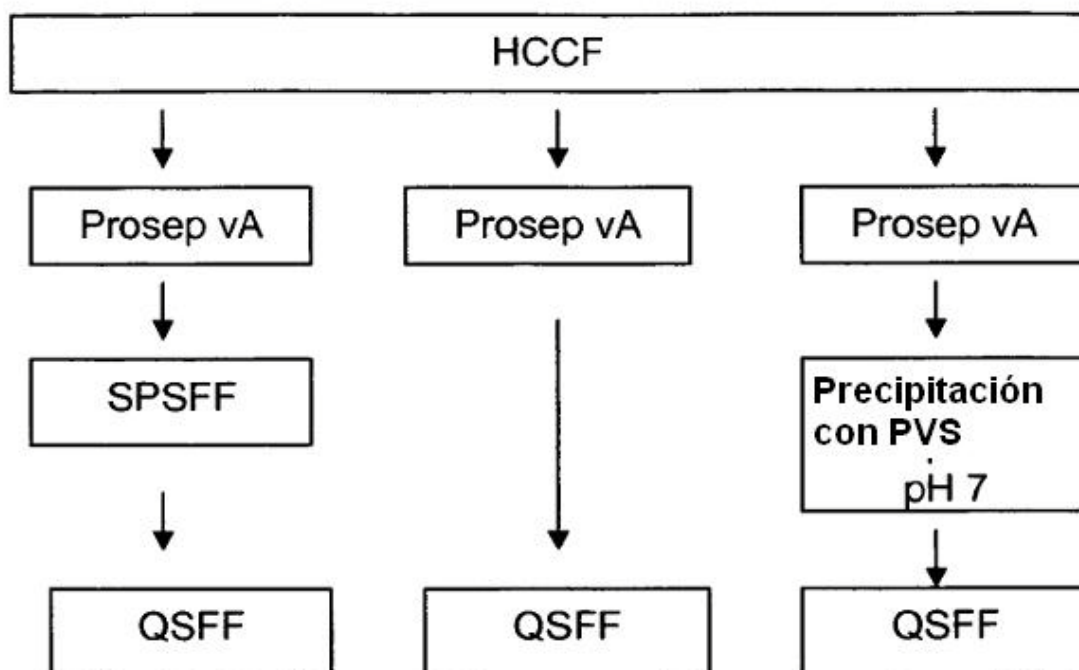


Figura 1

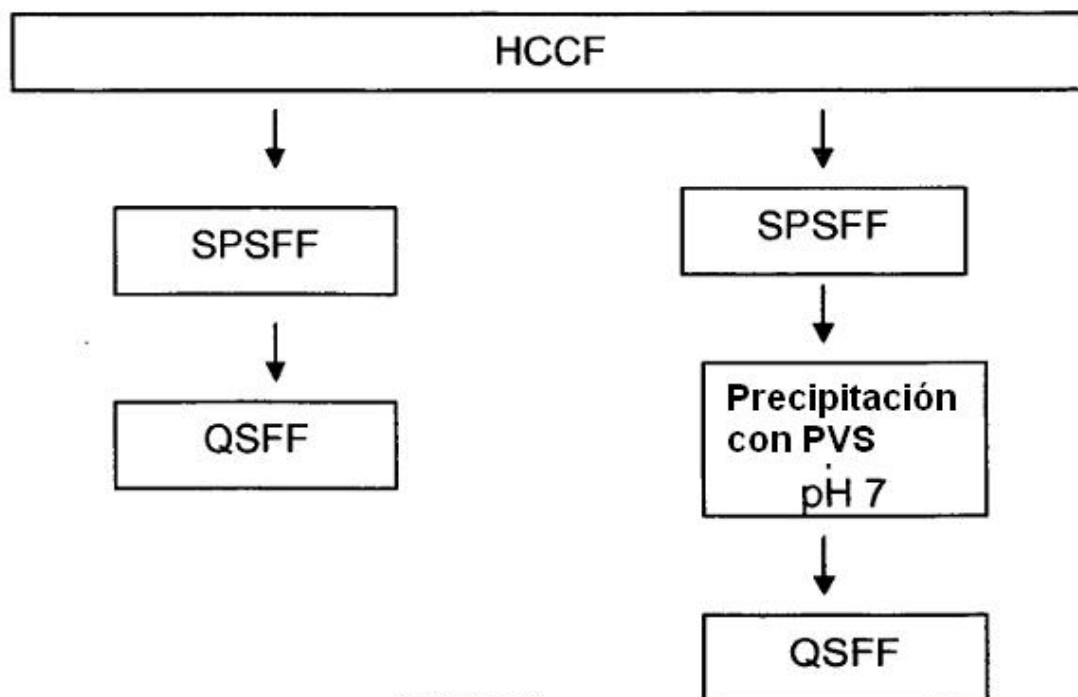


Figura 2

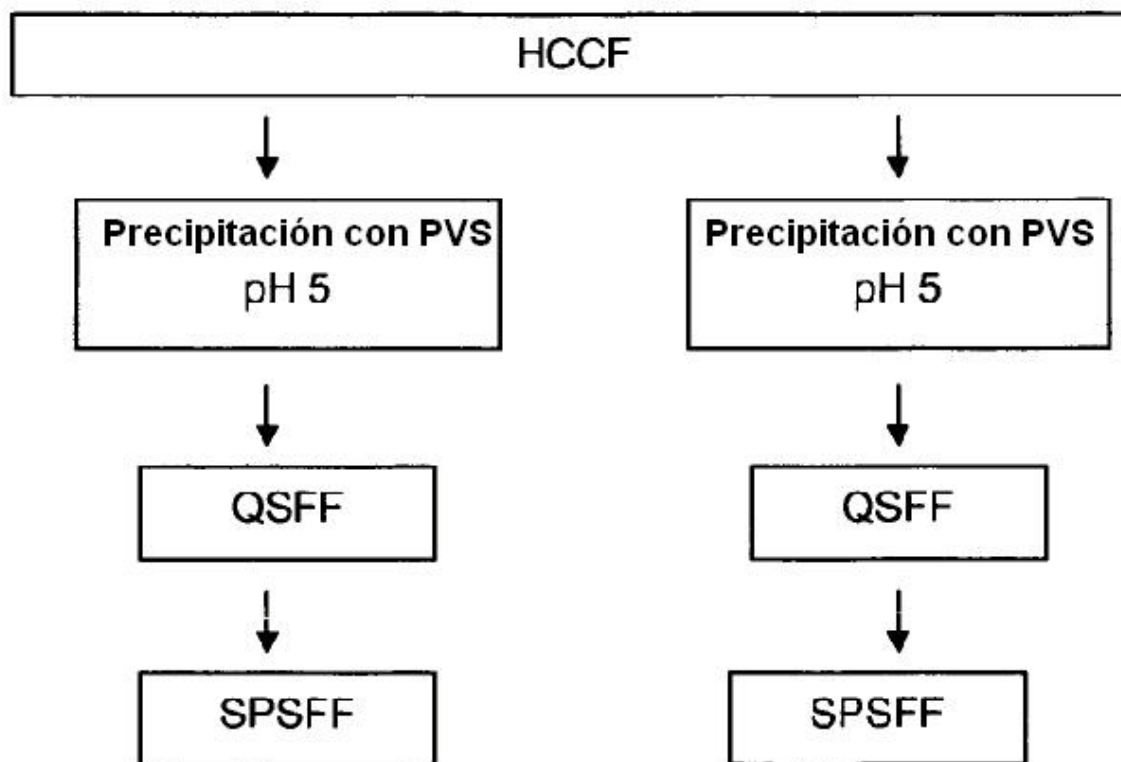


Figura 3

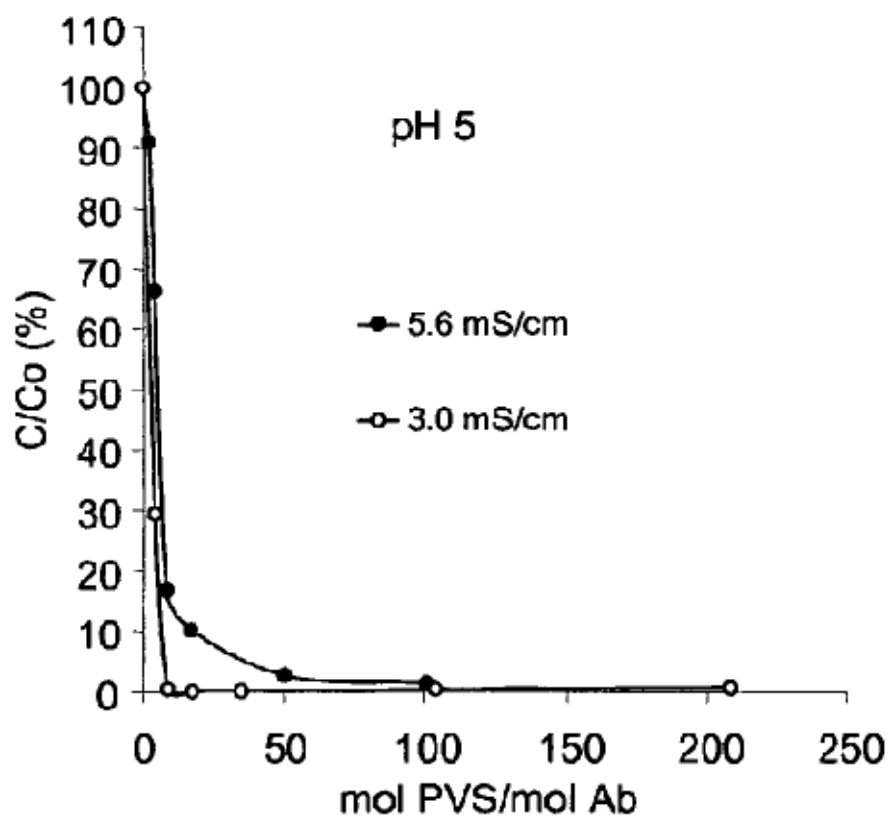


Figura 4

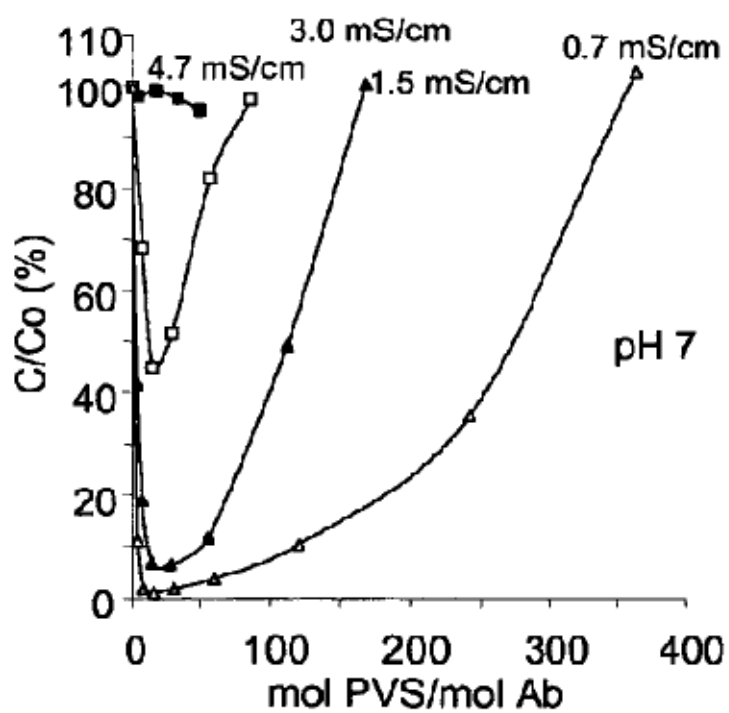


Figura 5

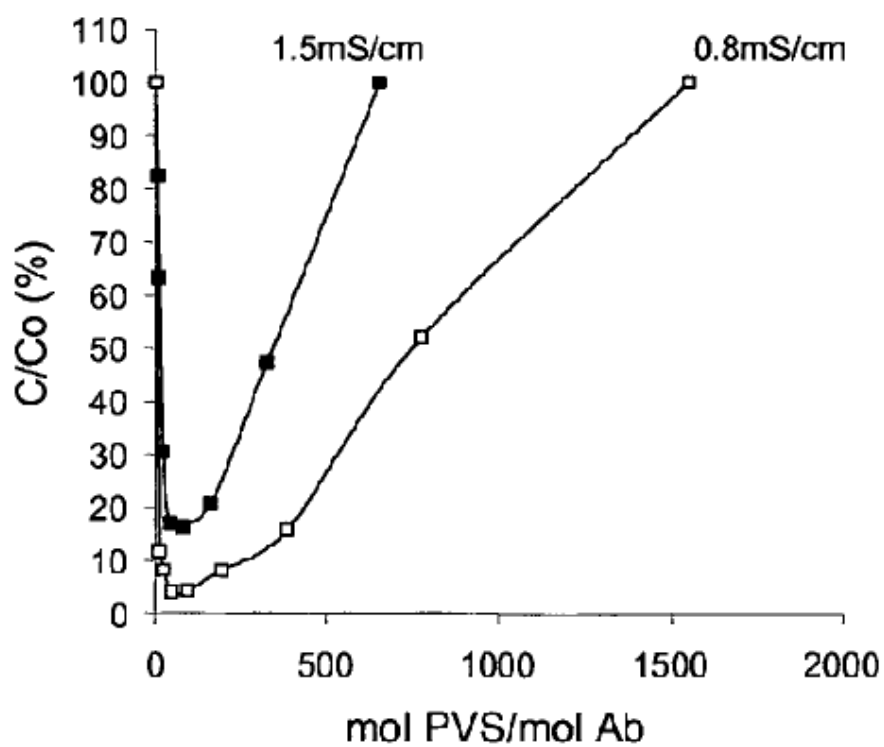


Figura 6

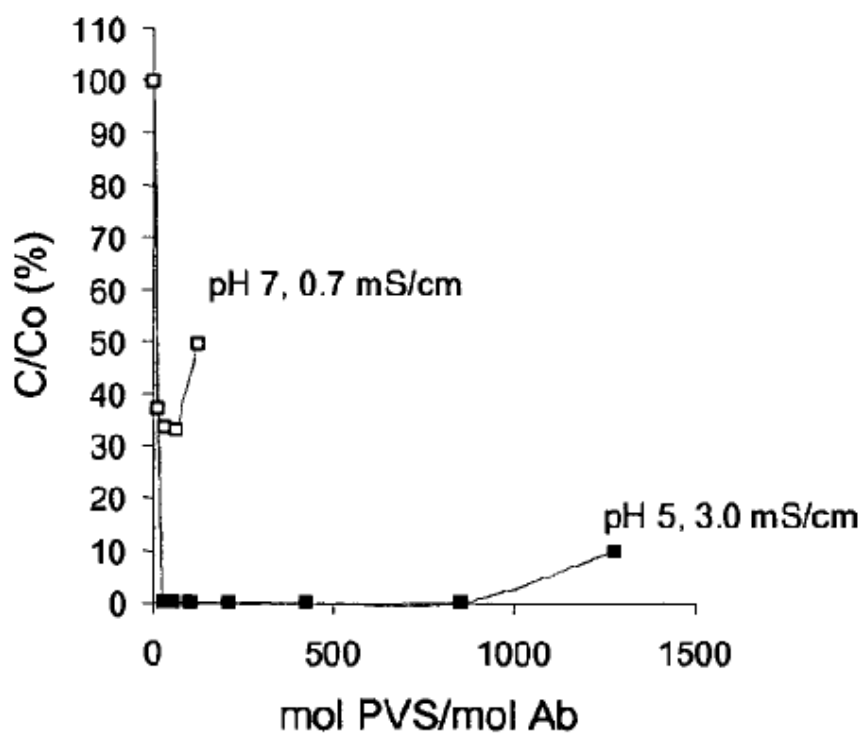


Figura 7

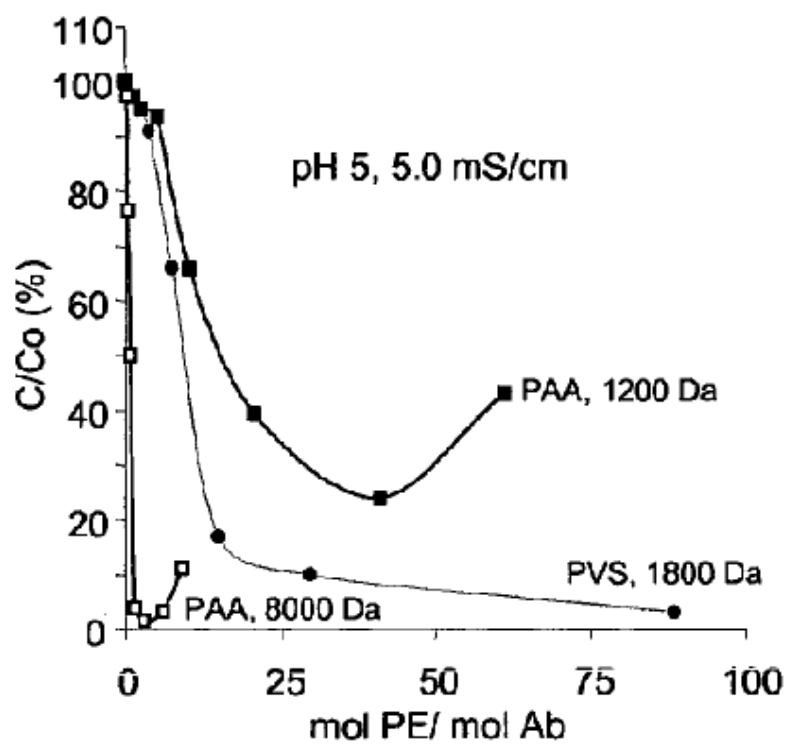


Figura 8

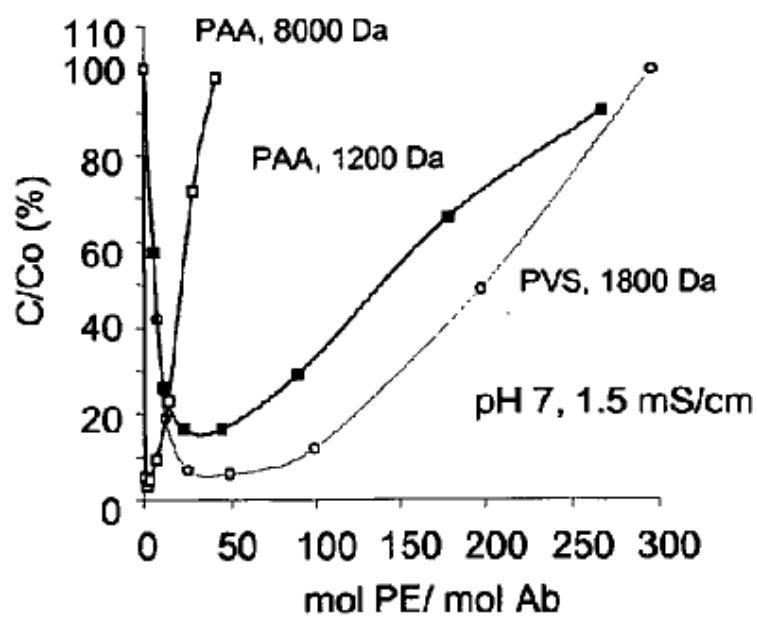


Figura 9

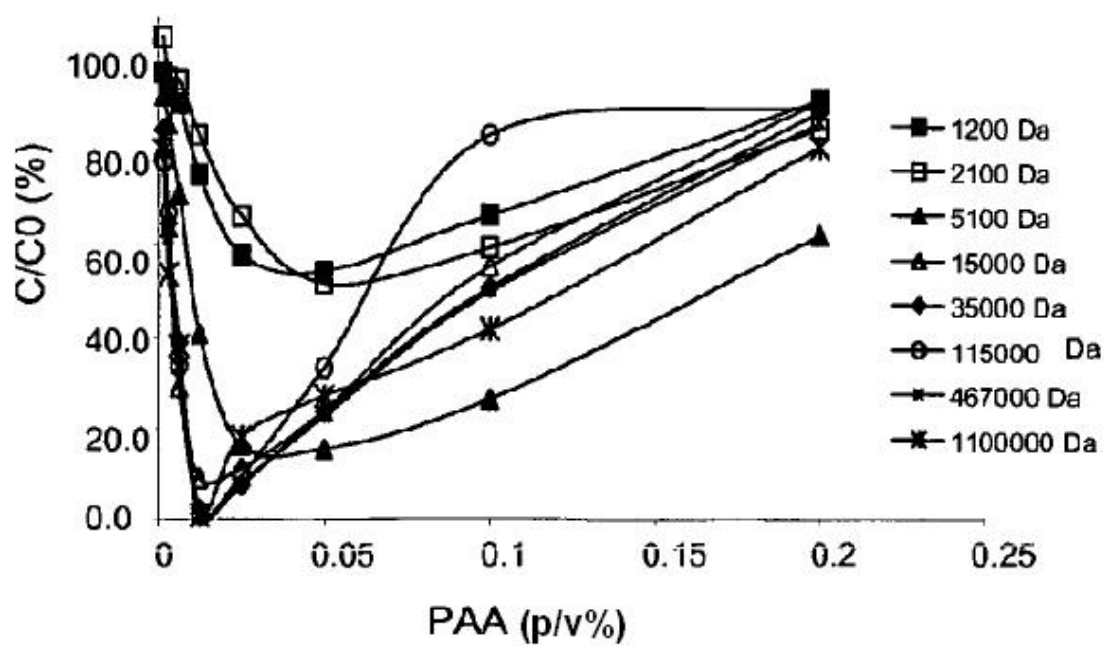


Figura 10

HCCF	Densidad de carga (mg/ml)	Rendimiento %	CHOP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Agregado (%)	Monómero (%)	Fragmento (%)	Insulina (ng/mg)	ADN (pg/mg)	Gentamicina (ng/mg)
a) HCCF procesado a través de proteína A	N/A	N/A	234276	N/A	N/D	N/D	N/D	2,410	2730769	25460
Proteína A	14	95	1105	23	0,80	98,92	0,27	0,002	198	9
SPSFF	40	95	199	<2	0,82	98,99	0,19	<0,034	<0,18	0,26
QSFF	40	96	<0,7	<2	0,71	99,28	0,01	<0,064	<0,34	0,24
Proteína A	14	95	1105	23	0,80	98,92	0,27	0,002	198	9
QSFF	40	97	3,9	23	0,64	99,11	0,25	<0,051	<0,27	5
Proteína A	14	100	1105	23	0,80	98,92	0,27	0,002	198	9
Precipitación PVS pH 7 *	N/A	100	244	4	0,74	99,21	0,04	<0,064	ND	1,26
QSFF	40	92	1,1	2	0,68	99,29	0,03	<0,080	<0,42	1,29
b) HCCF procesado a través de SPSFF	10	82	4252	N/A	0,34	90,42	9,24	<0,086	0,55	146
QSFF	40	100	71	N/A	0,28	90,99	8,73	<0,154	1,37	170
SPSFF	10	82	4252	N/A	0,34	90,42	9,24	<0,086	0,55	146
Precipitación PVS pH 7 *	N/A	86	190	N/A	0,61	95,78	3,61	<0,155	ND	8
QSFF	40	95	4,1	N/A	0,51	95,98	3,51	<0,177	0,94	8
c) Precipitación de HCCF con PVS	N/A	88	92854	N/A	1,75	95,93	2,32	2,077	ND	4484
Precipitación PVS pH 5 *	37	90	1589	N/A	0,21	99,30	0,49	1,934	2,05	2454
QSFF	35	95	33	N/A	0,50	94,35	5,15	<0,042	<0,22	13
SPSFF	N/A	82	27422	N/A	3,60	95,93	0,47	0,009	ND	2014
Precipitación PVS pH 7 *	40	95	361	N/A	1,19	98,81	0,00	<0,192	4,35	1158
QSFF	40	102	18	N/A	0,99	98,80	0,21	<0,033	<0,18	4
SPSFF										

Figura 11

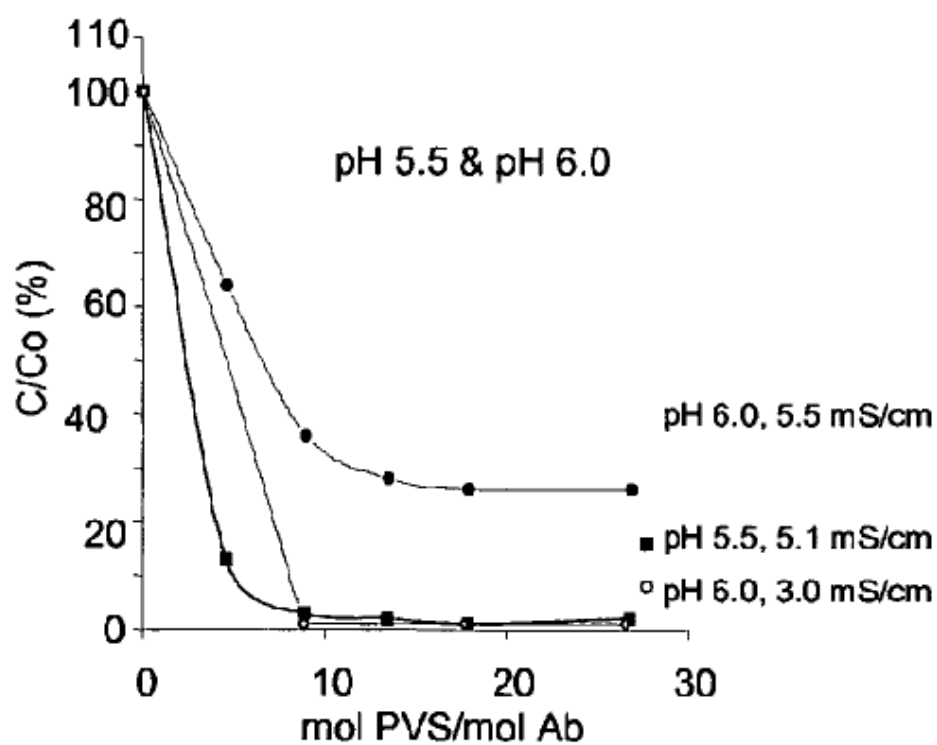


Figura 12

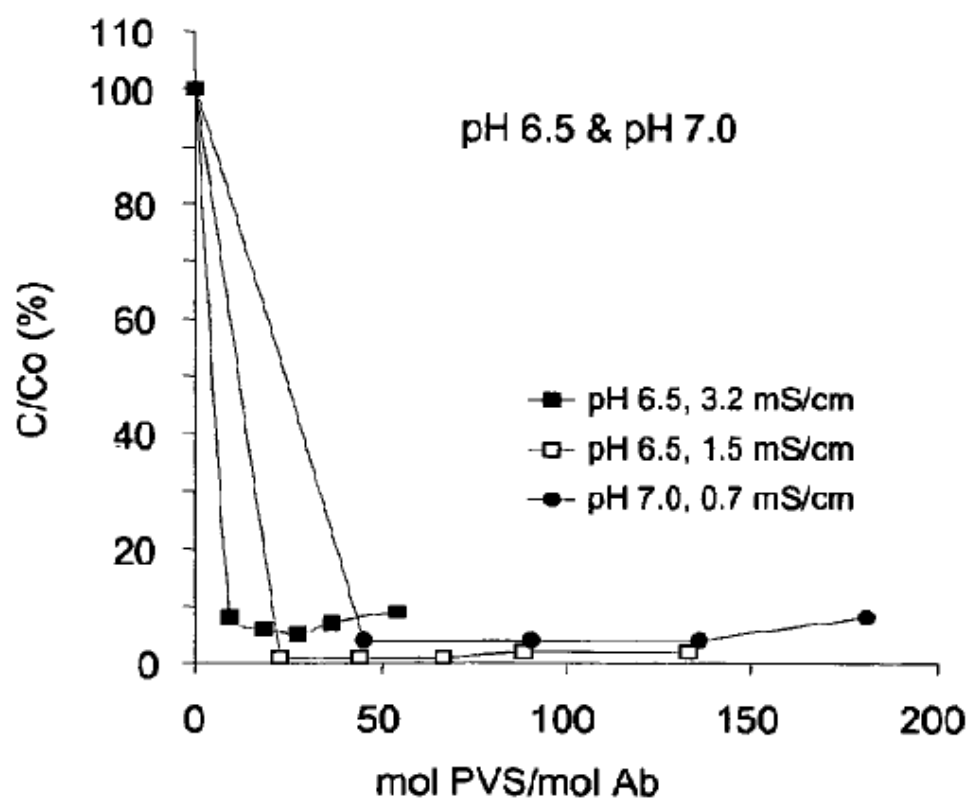
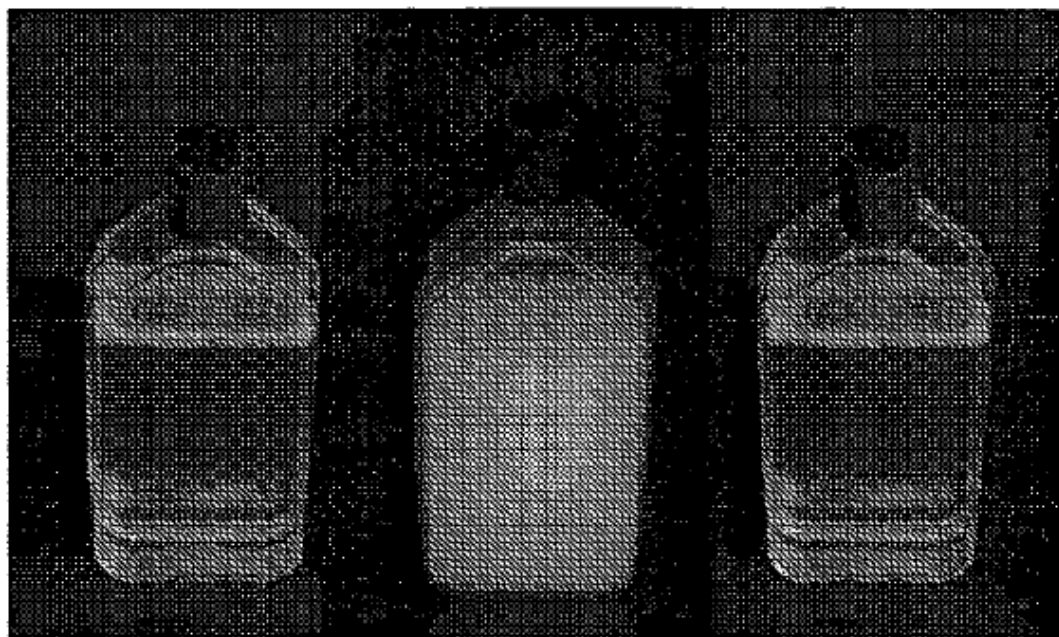


Figura 13



0% PVS (p/v)	0.1% PVS (p/v)	1% PVS (p/v)
Apomab en solución	Precipitación de Apomab	Apomab se redisuelve

Figura 14

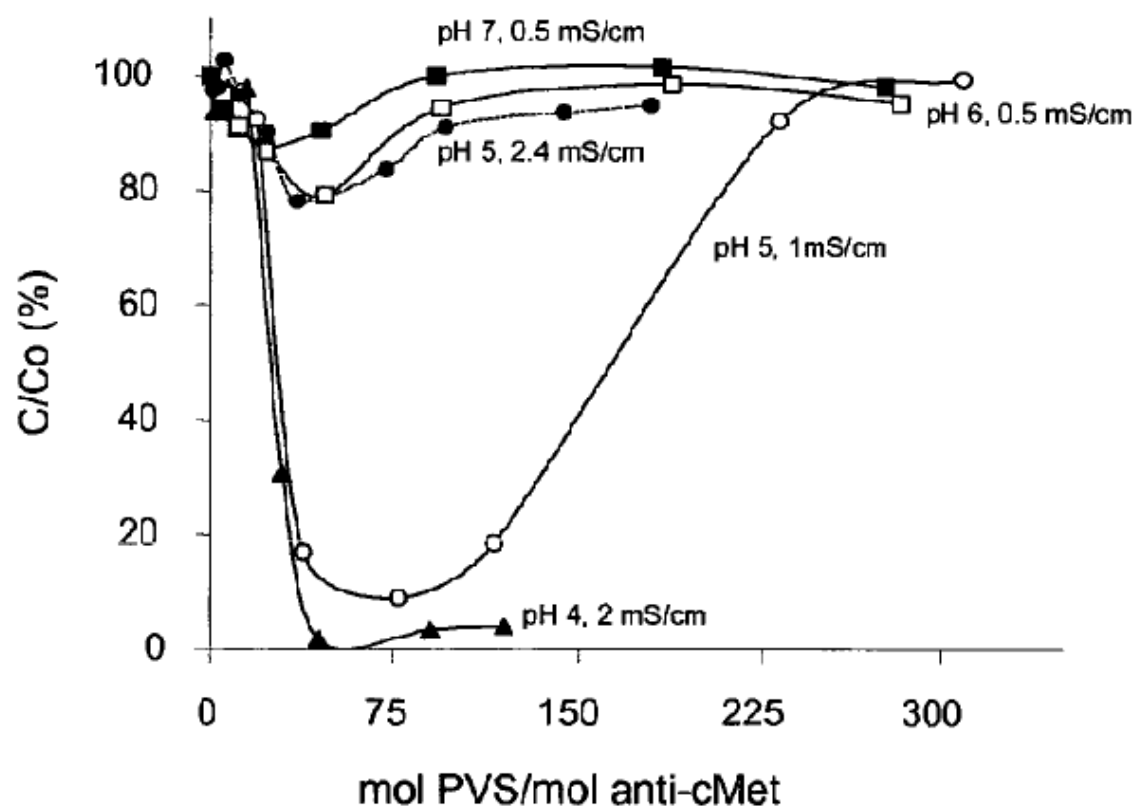


Figura 15

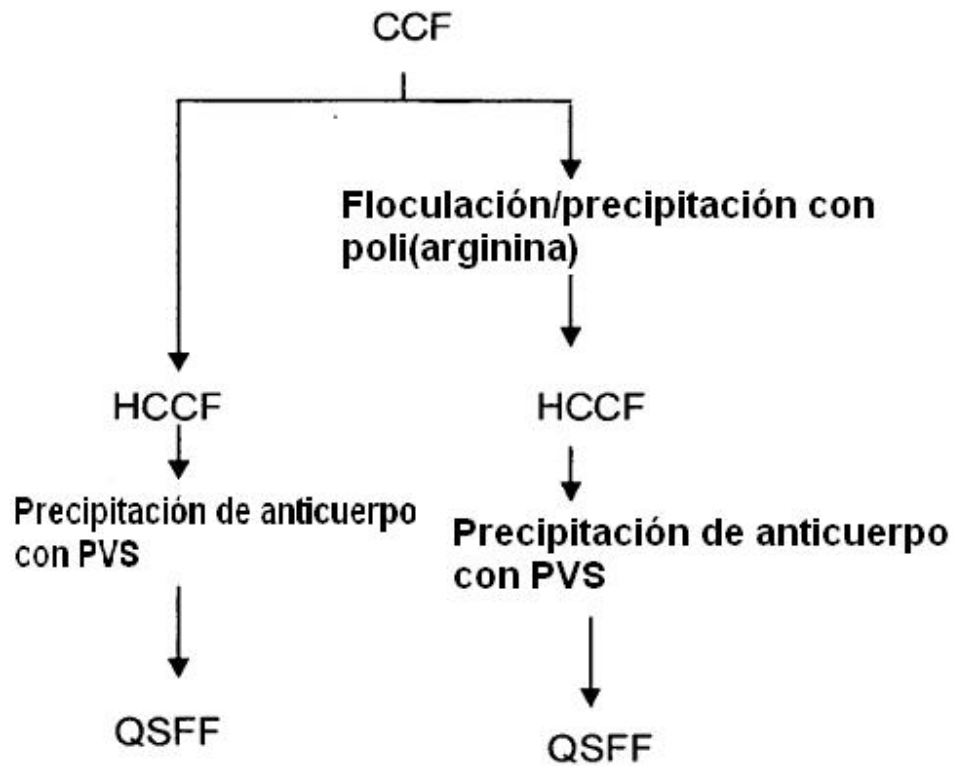


Figura 16

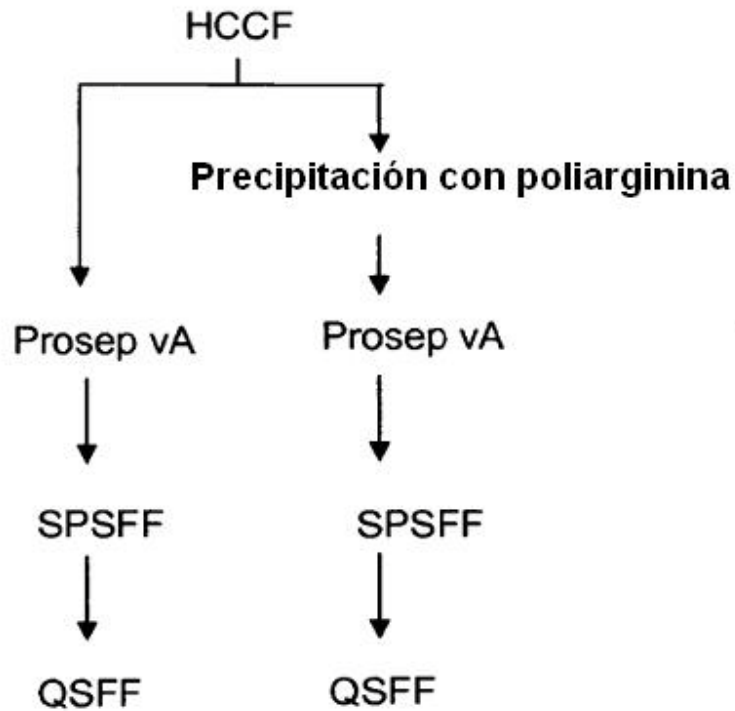


Figura 17

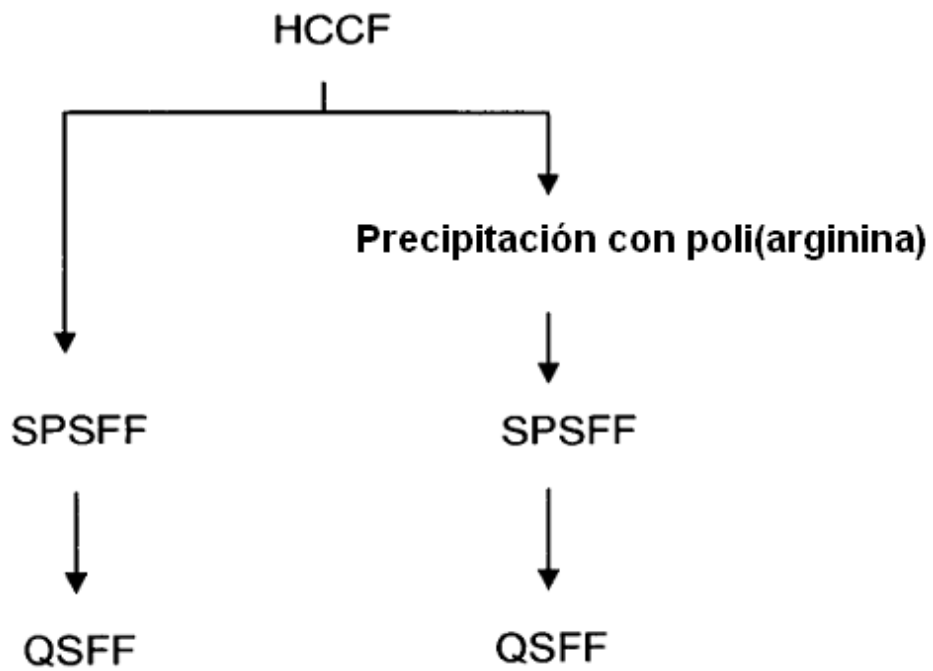


Figura 18

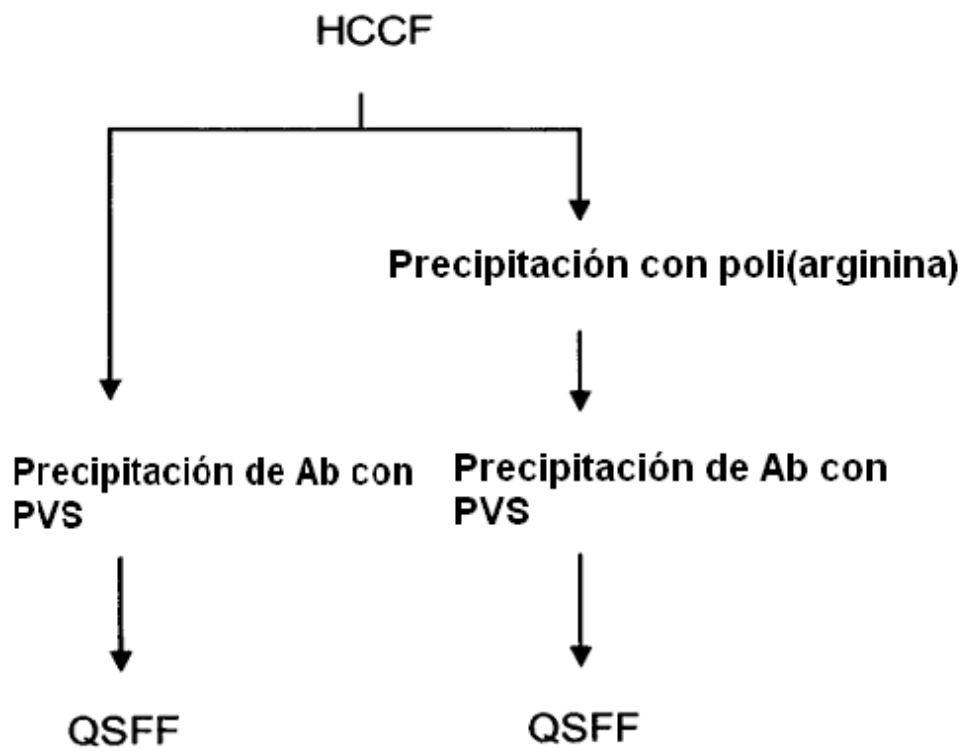


Figura 19

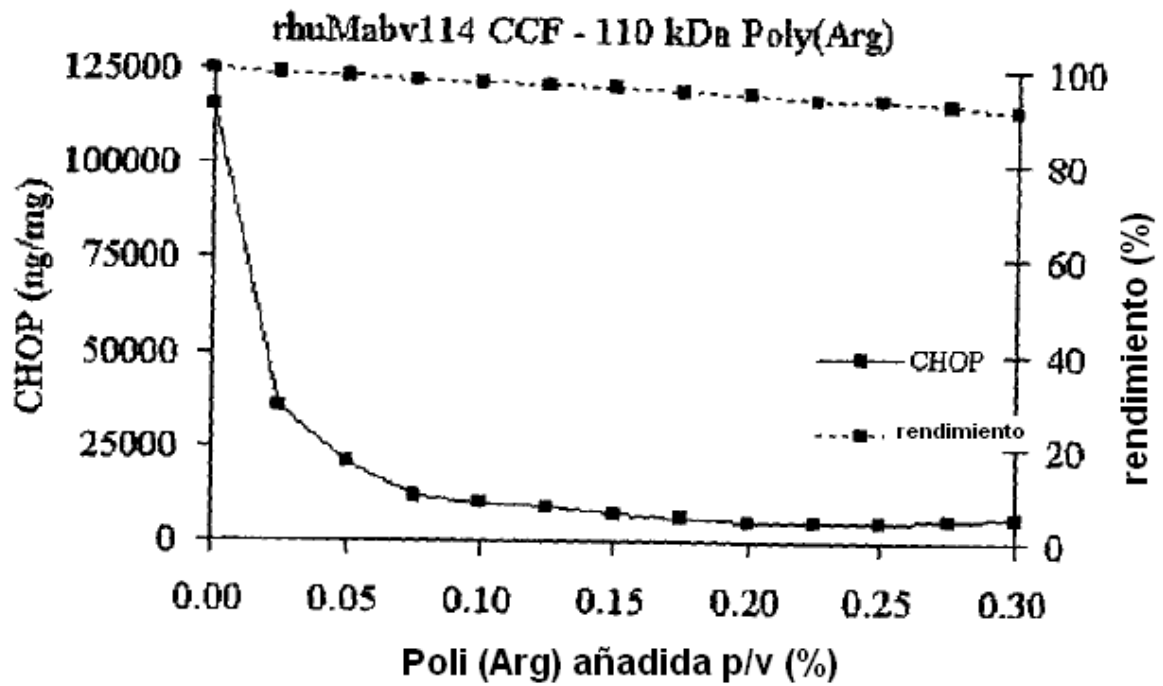


Figura 20

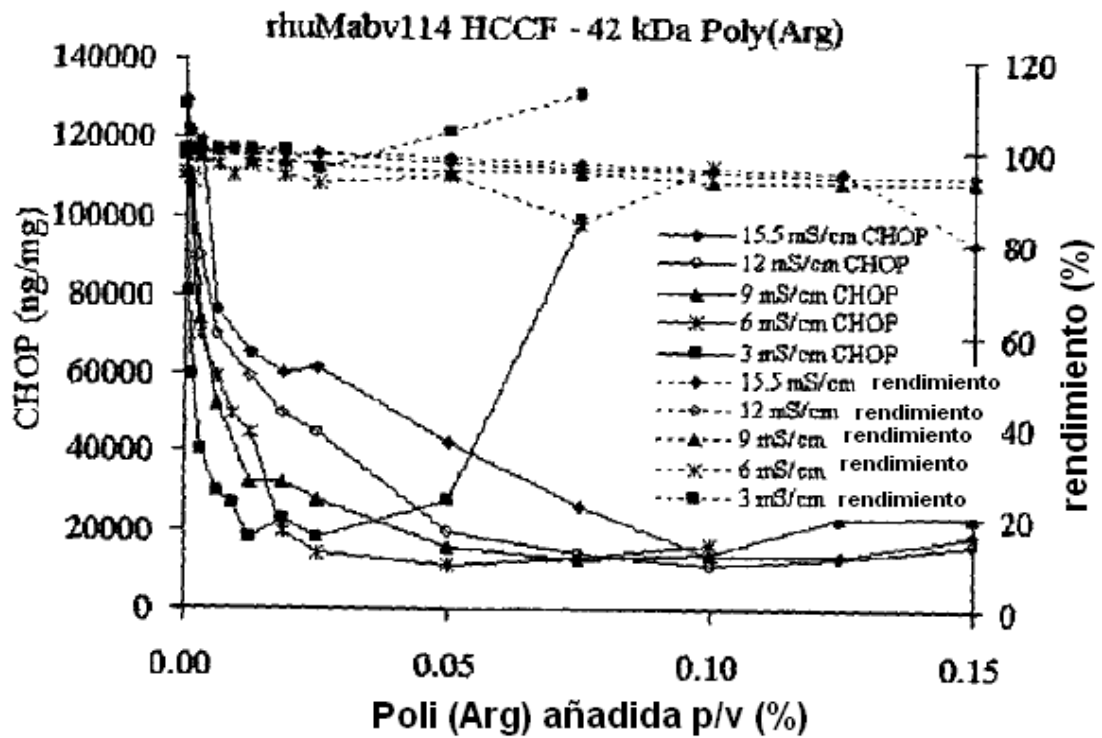


Figura 21

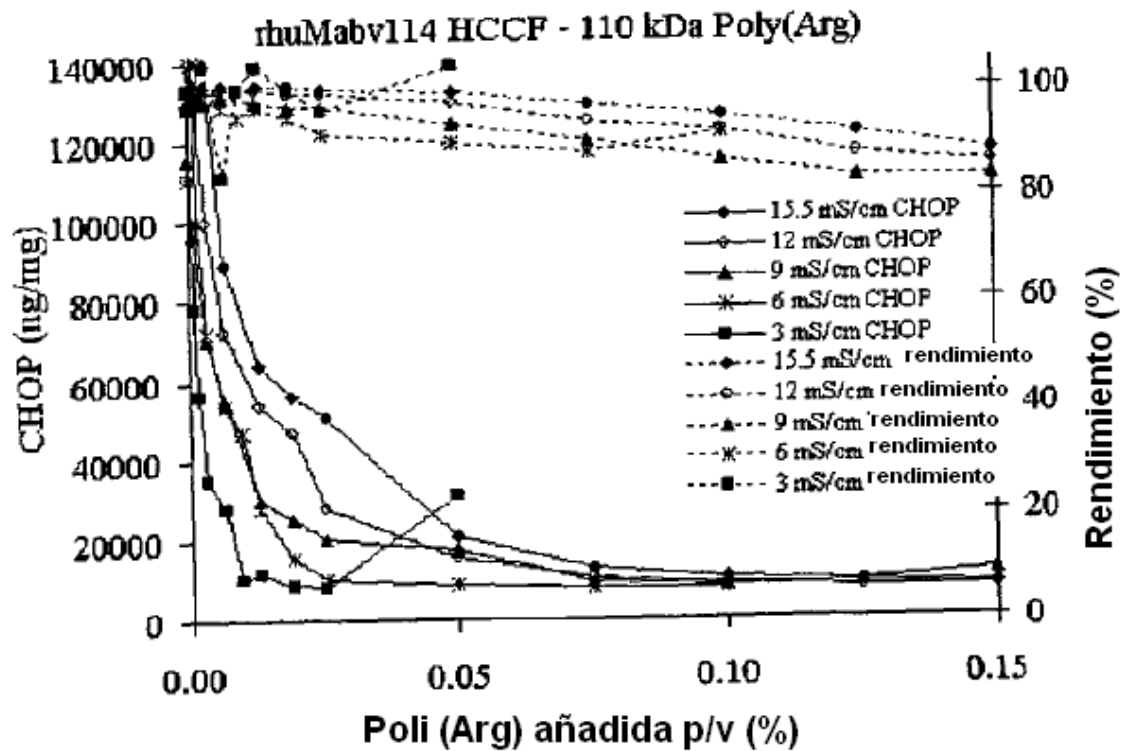


Figura 22

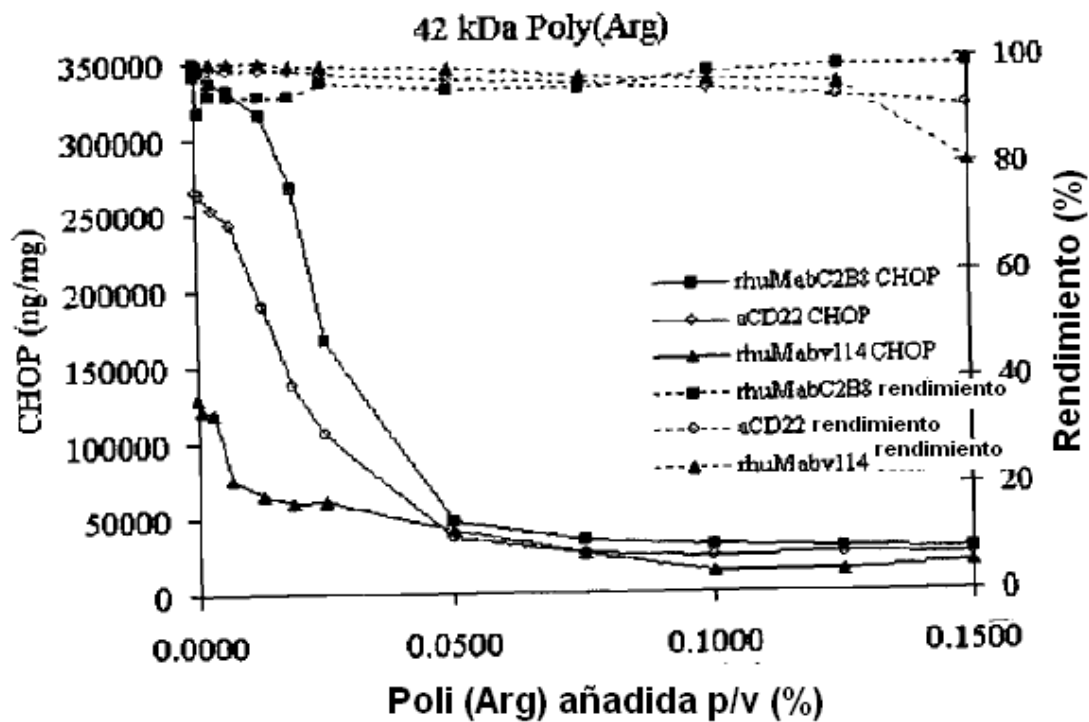


Figura 23

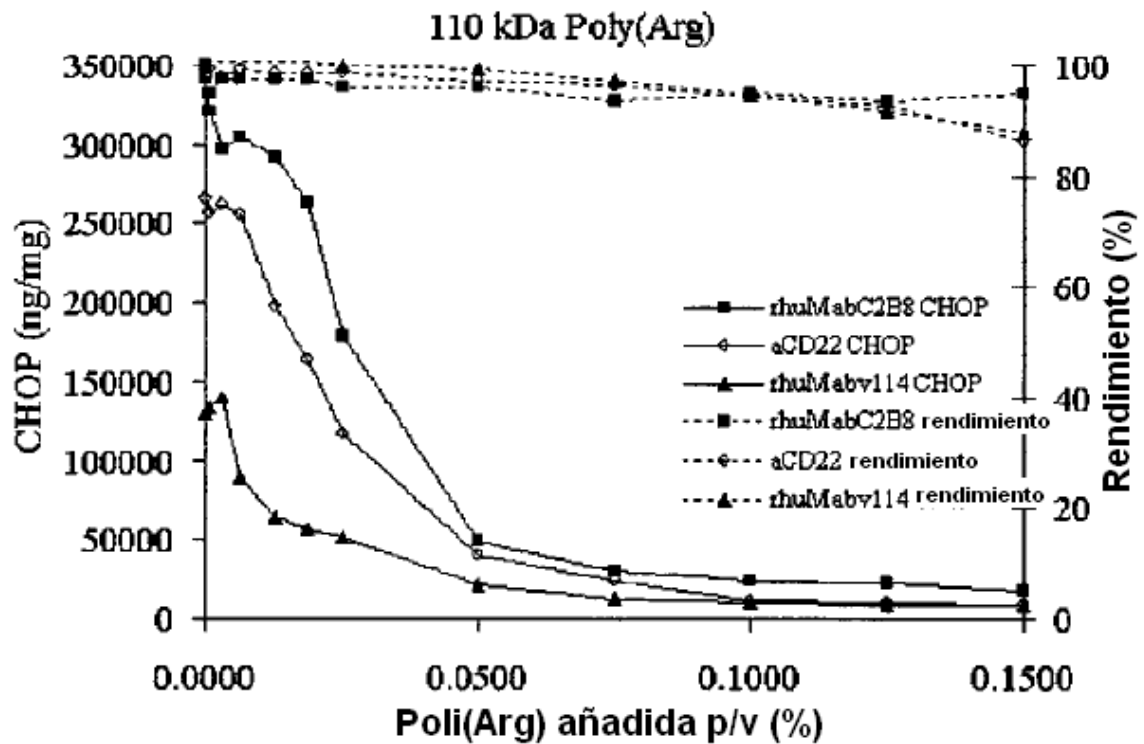


Figura 24

Precipitación con PVS de CCF de rhuMabv114 flocculado

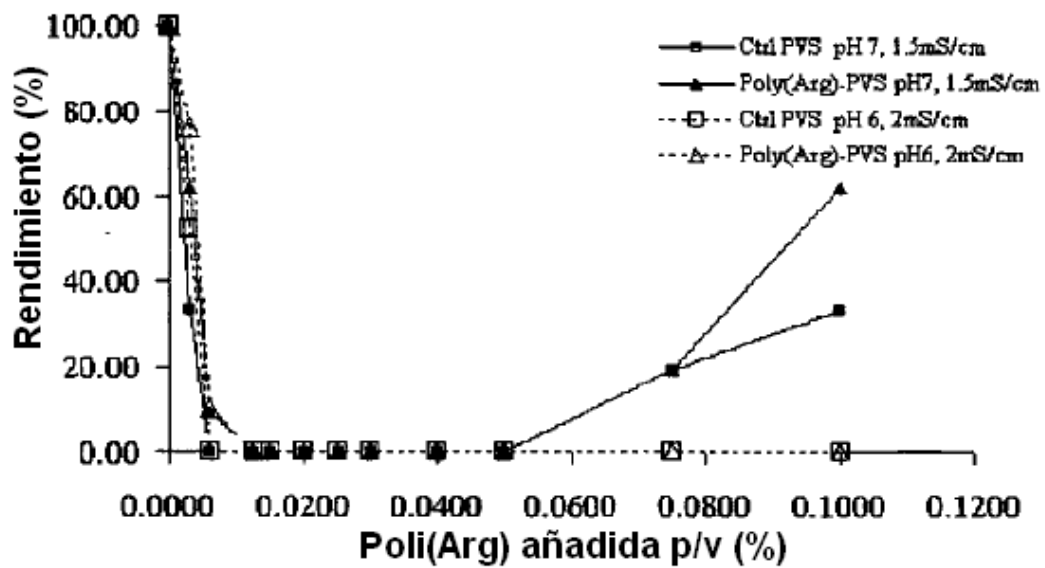


Figura 25

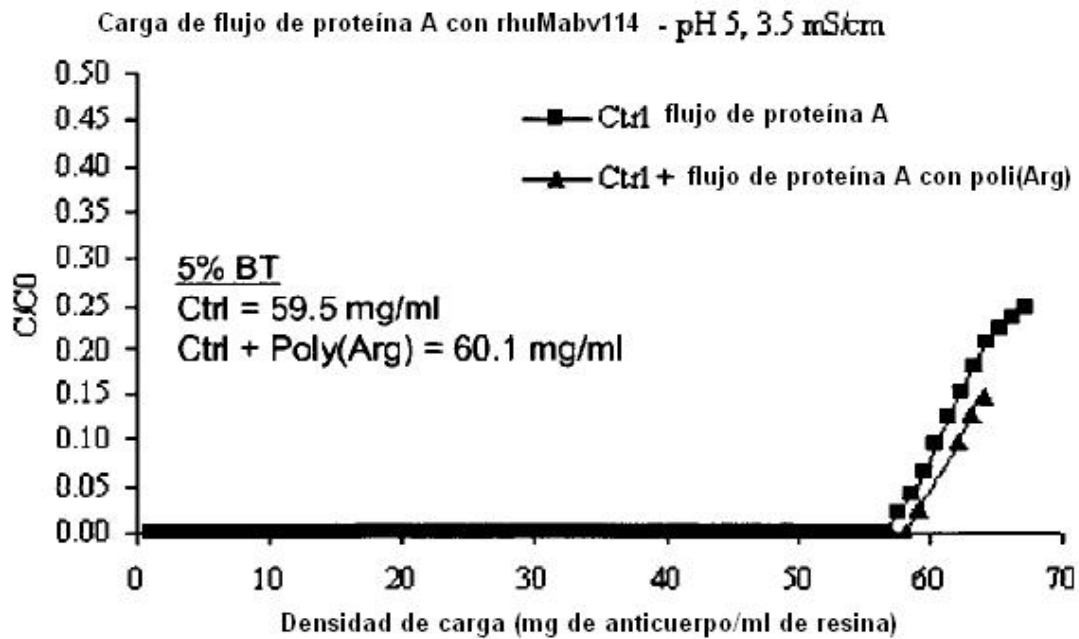


Figura 26

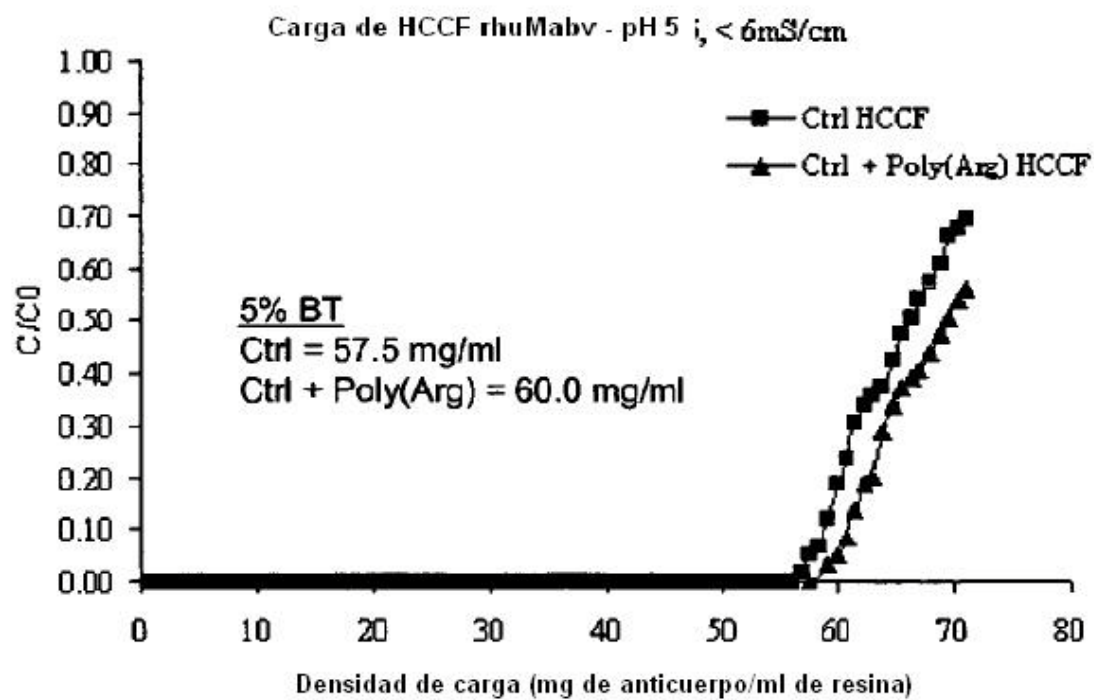


Figura 27

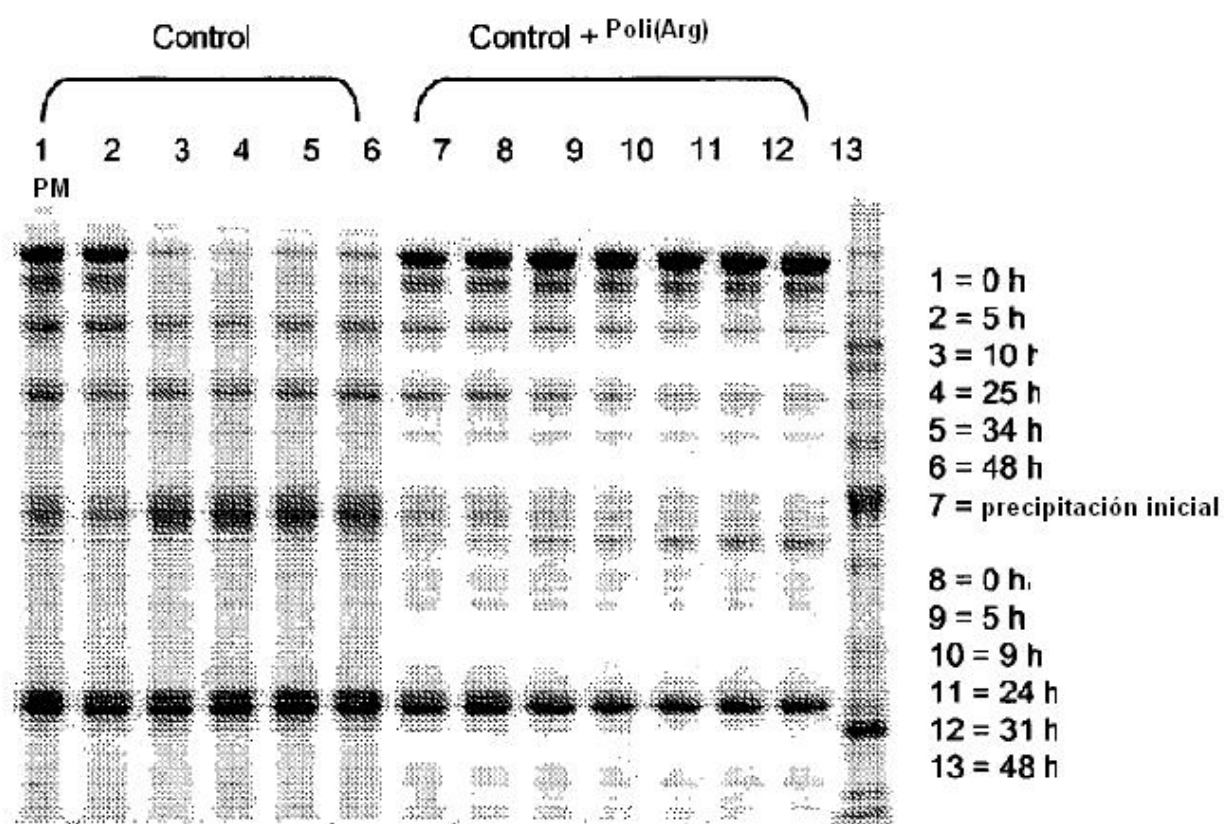


Figura 28

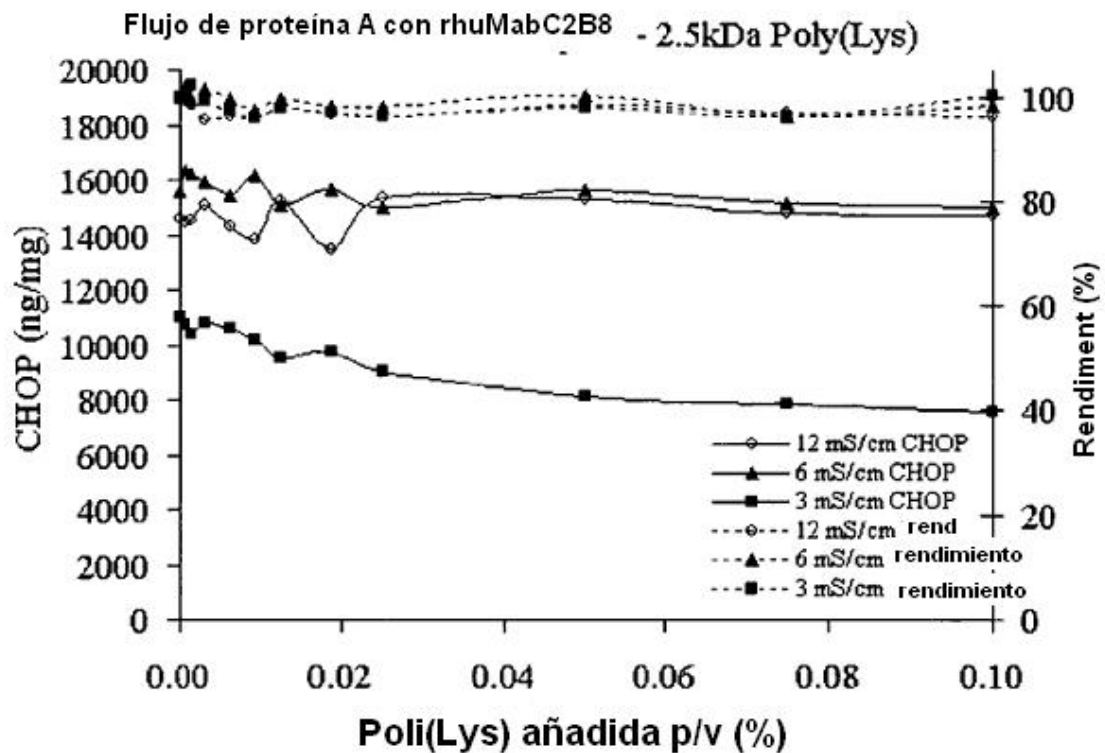


Figura 29

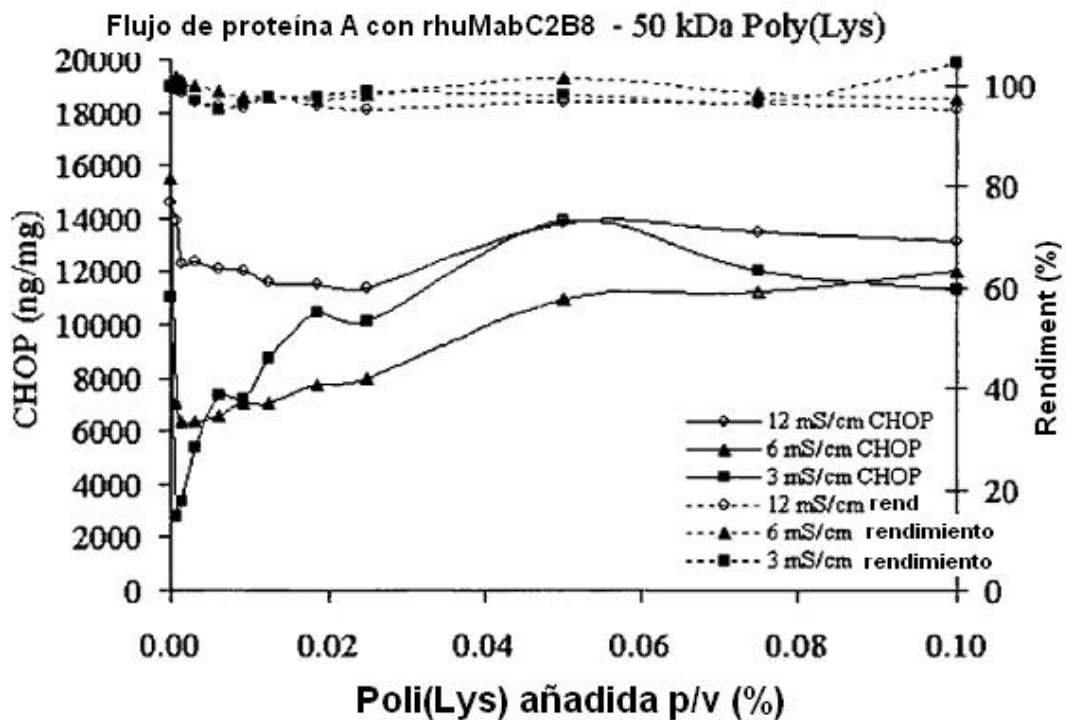


Figura 30

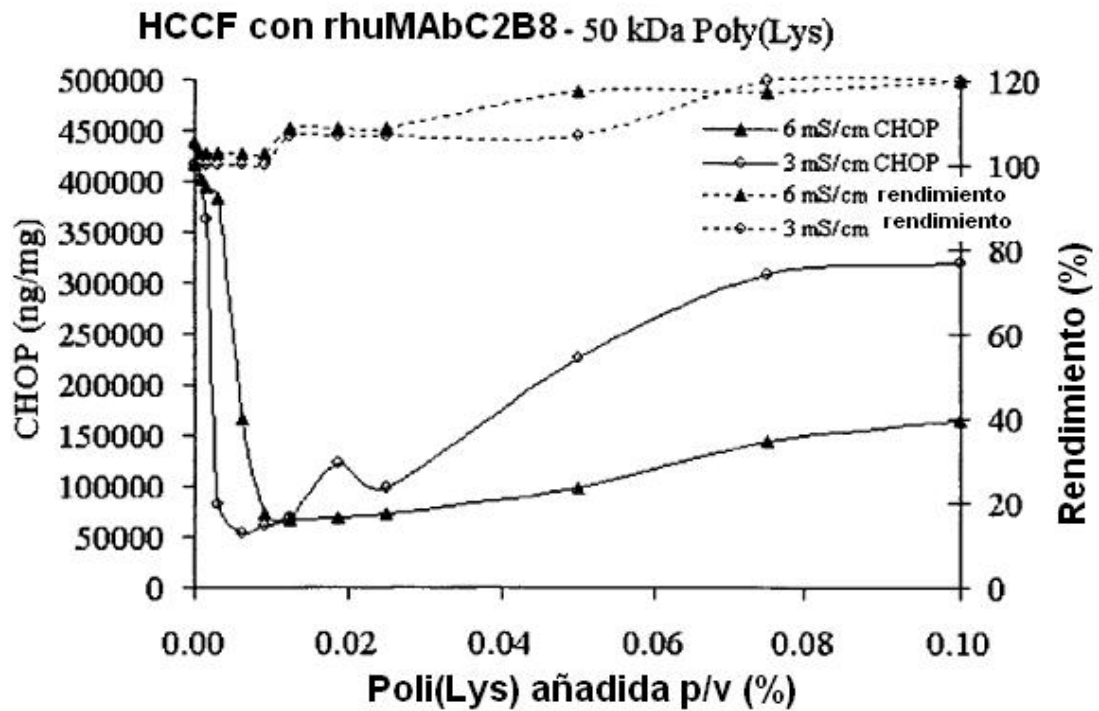


Figura 31

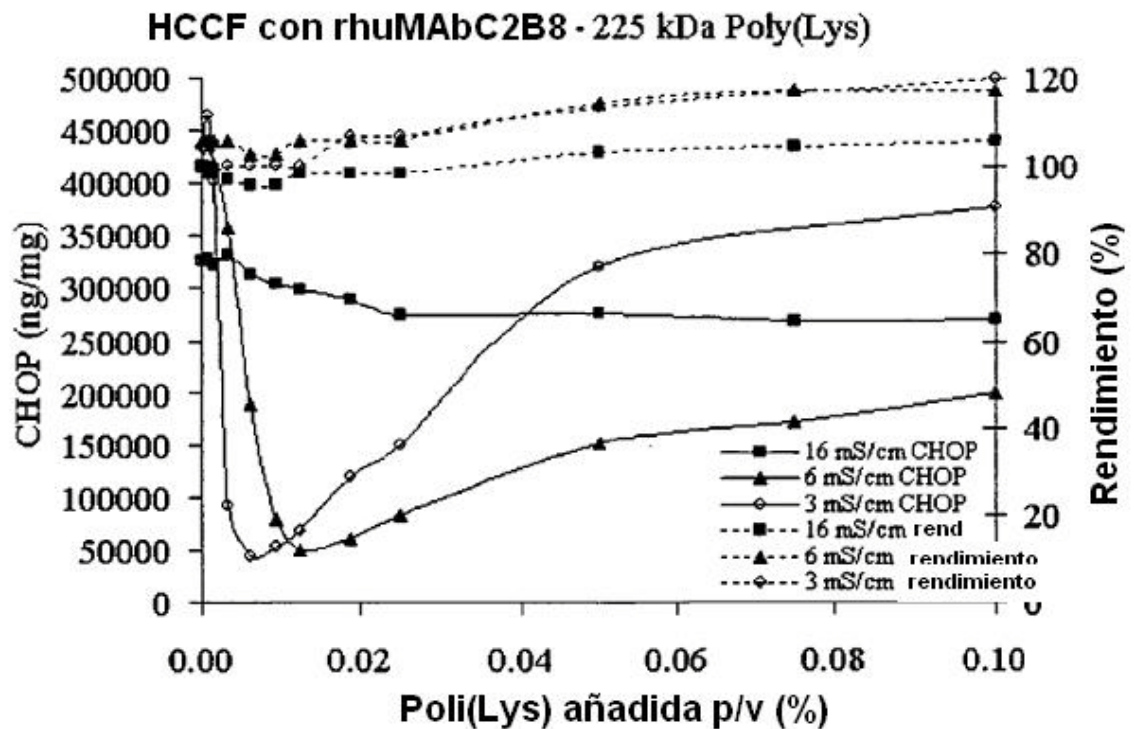


Figura 32

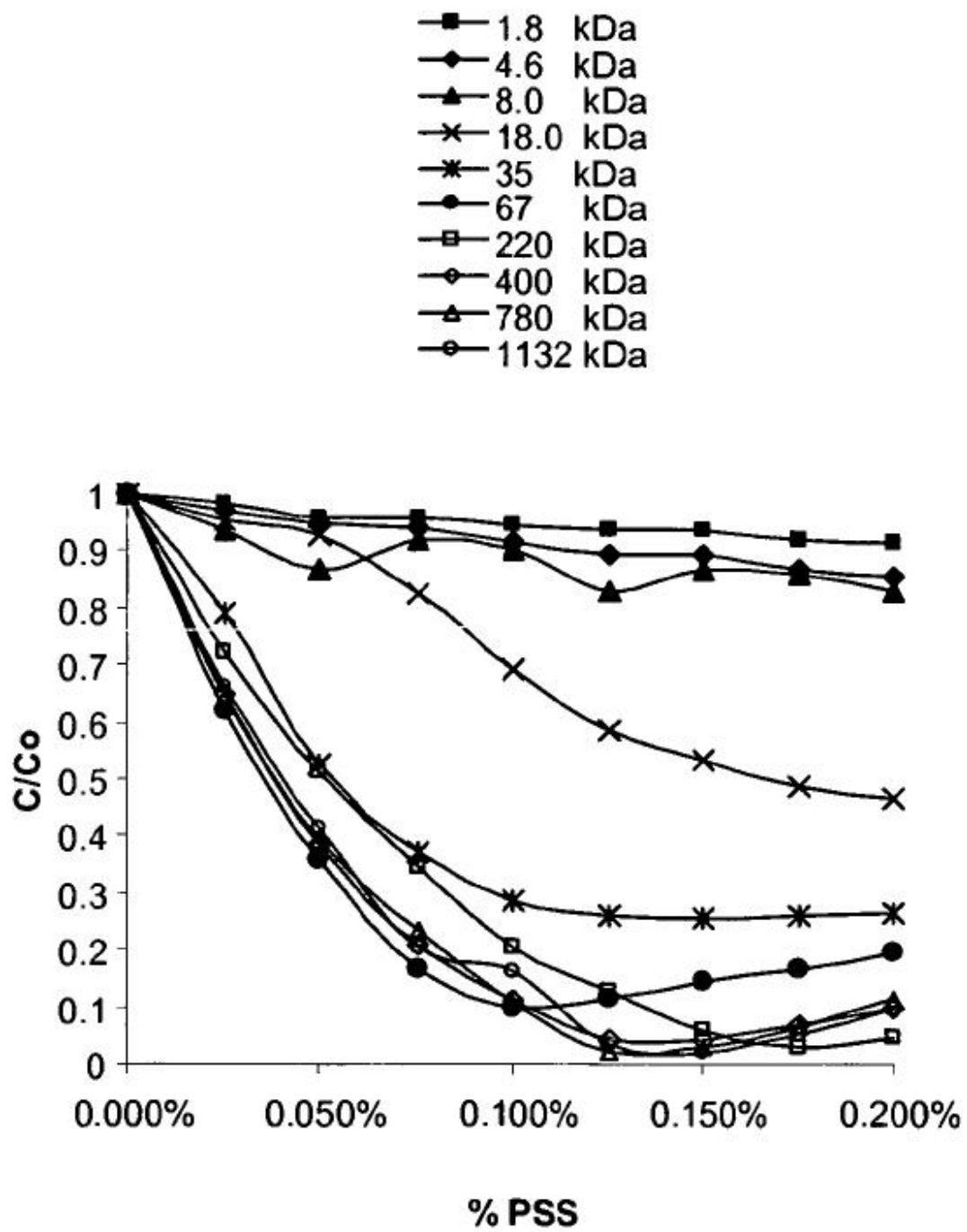


Figura 33

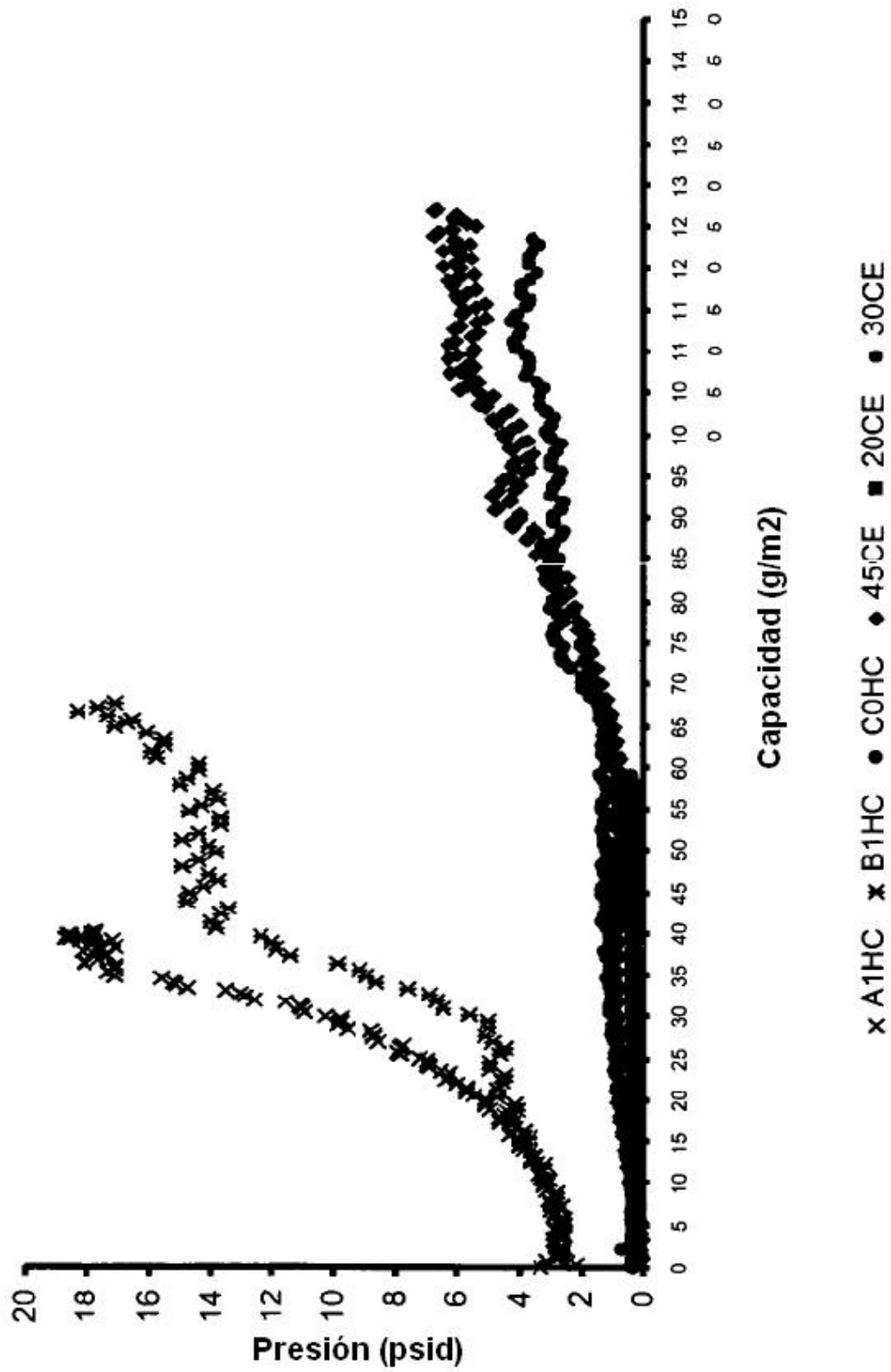


Figura 34

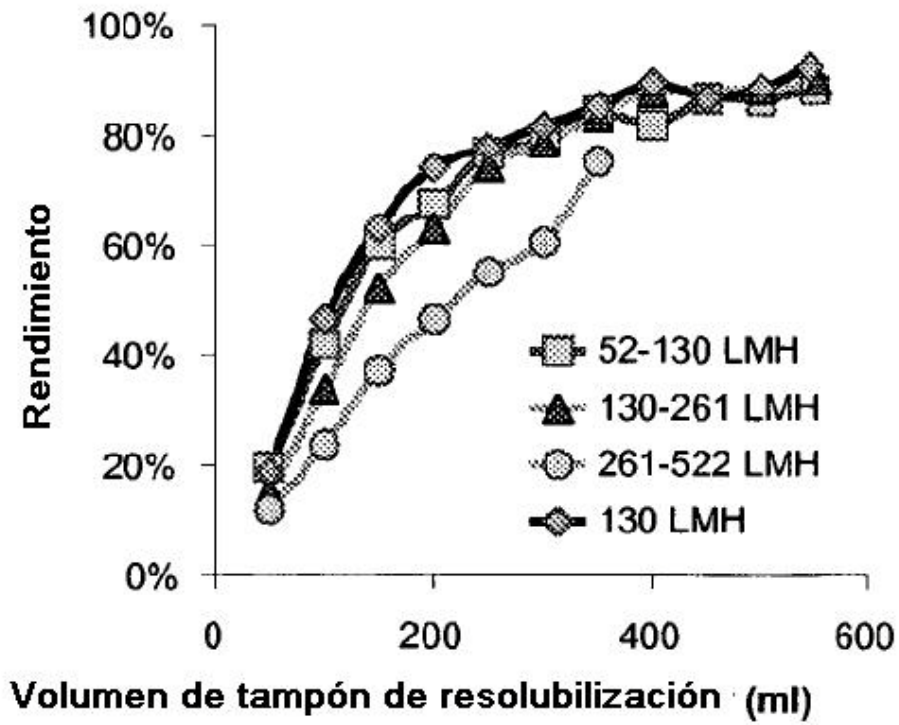


Figura 35

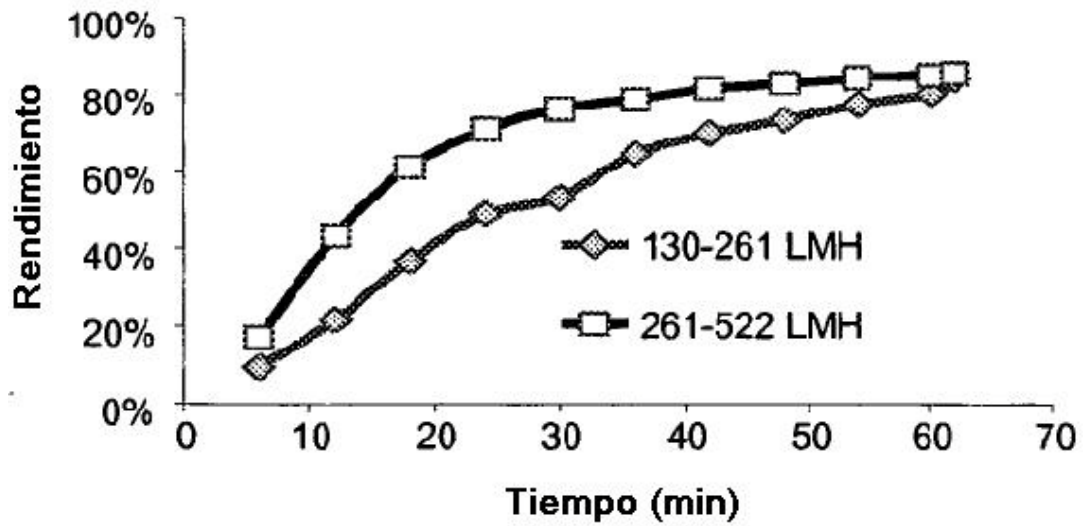


Figura 36

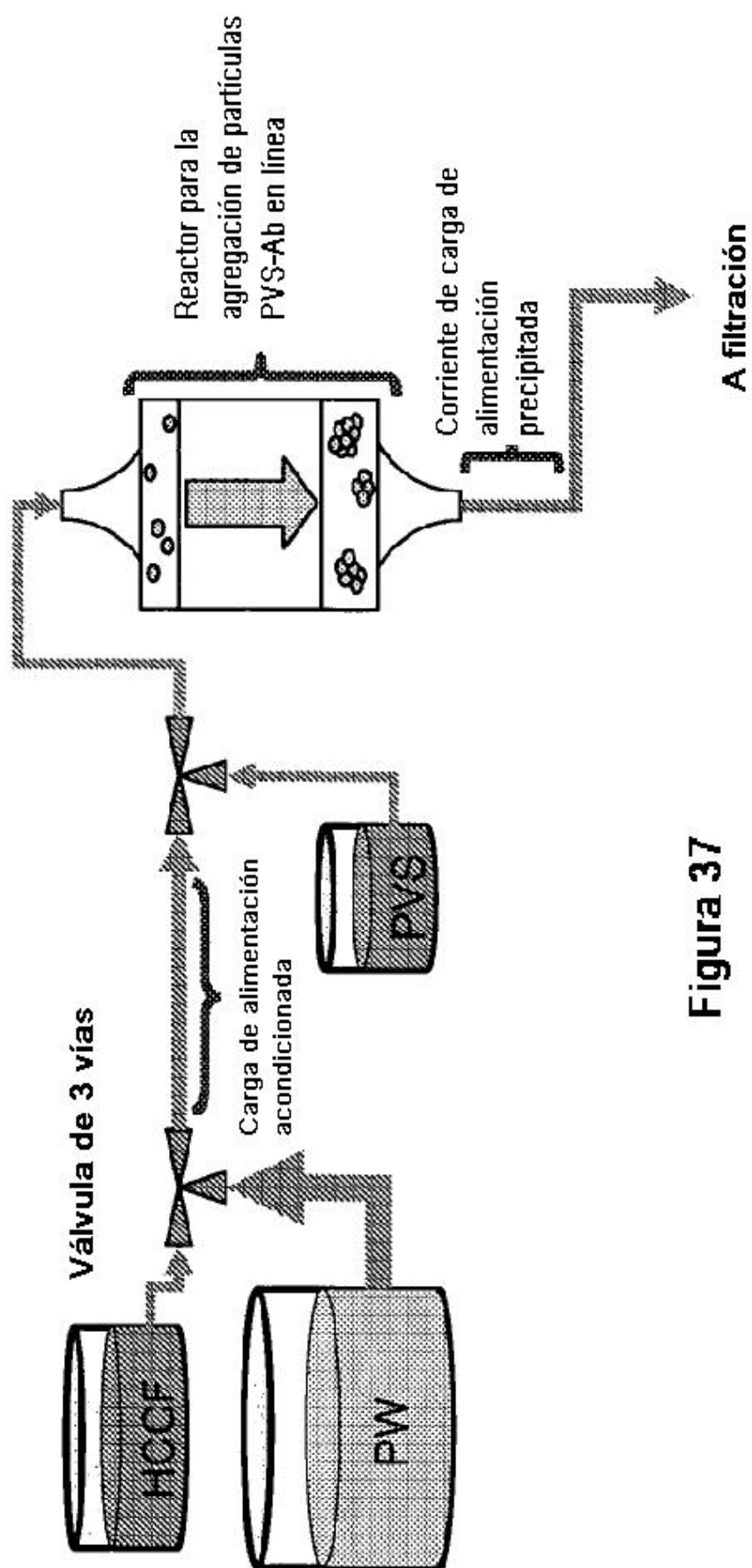


Figura 37

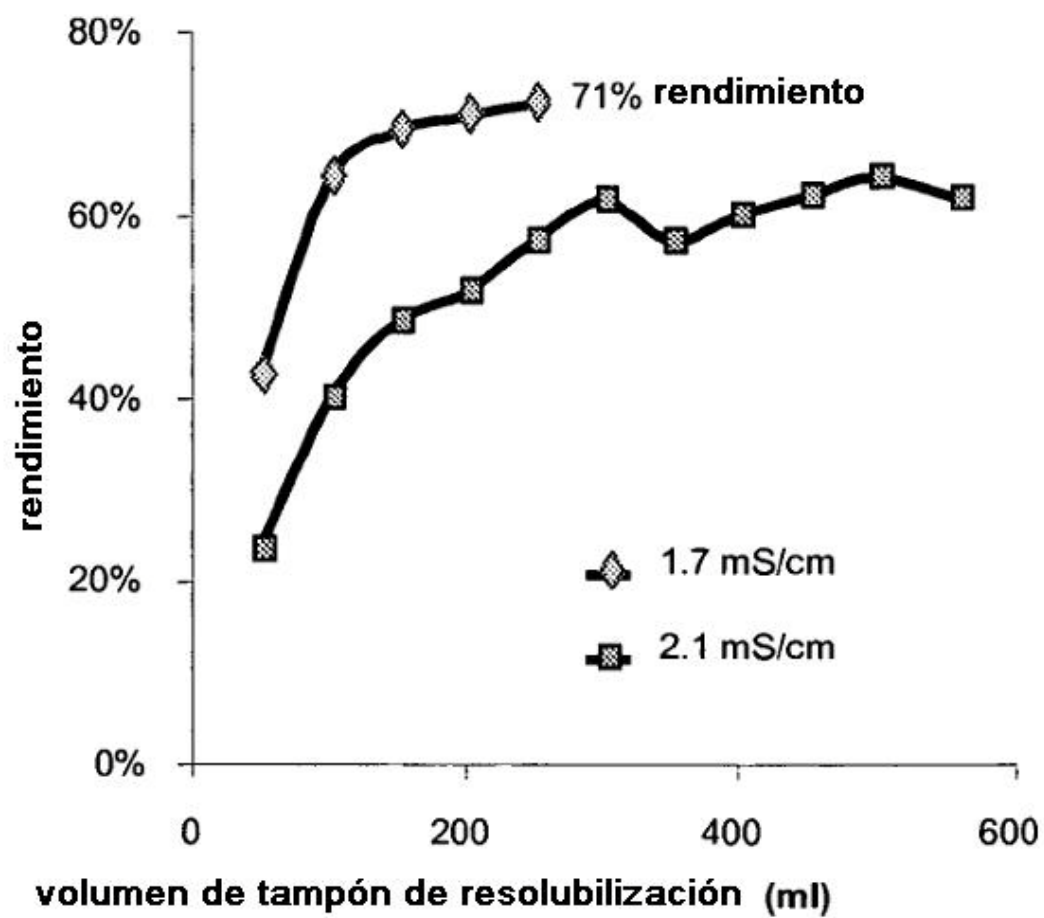


Figura 38