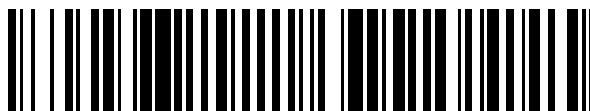


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 650**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006** **E 06785208 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013** **EP 1896506**

54 Título: **Métodos de purificación de anticuerpos anti A beta**

30 Prioridad:

17.06.2005 US 691821 P

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

07.05.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
(50.0%)**

**Little Island Industrial Estate
Little Island, County Cork, IE y
WYETH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GODAVARTI, RANGANATHAN y
ISKRA, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 402 650 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de purificación de anticuerpos anti A beta.

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos "METHODS OF PURIFYING Fc REGION CONTAINING PROTEINS", presentada el 17 de junio de 2005 con número de serie 60/691821.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad de Alzheimer ("EA") es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la aparición de placas de amiloide, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal significativa. La proteína β -amiloide (también conocida como péptido A β), el principal componente de las placas seniles, ha sido implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe (1989) Cell 58:611-612; Hardy (1997) Trends Neurosci. 20:154-159). Se ha demostrado que la β -amiloide es directamente tóxica para las neuronas cultivadas (Lorenzo y Yankner (1996) Ann. NY Acad. Sci. 777:89-95) e indirectamente tóxica a través de diversos mediadores (Koh *et al.*, (1990) Brain Research 533:315-320; Mattson *et al.*, (1992) J. Neurosciences 12:376-389). Además, los modelos *in vivo*, incluyendo un modelo en ratas y el de ratón PDAPP, han vinculado la β -amiloide a déficits de aprendizaje, modificación de la función cognitiva, e inhibición de la potenciación del hipocampo a largo plazo (Chen *et al.*, (2000) Nature 408:975-985; Walsh *et al.*, (2002) Nature 416:535-539). Por lo tanto, gran parte del interés se ha centrado en las terapias que modifican los niveles de β -amiloide para reducir potencialmente la gravedad o incluso eliminar la propia enfermedad.

Una estrategia de tratamiento de la EA que ha surgido recientemente en respuesta a estudios exitosos en modelos experimentales en ratas y en ratón PDAPP, es la de la inmunización pasiva de individuos para proporcionar inmunoglobulinas tales como anticuerpos específicos para la β -amiloide. (Véase, por ejemplo, Bard *et al.*, (2000) Nat. Med. 6:916-919 y Bard *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 100:2023-2028). Recientemente, se ha demostrado también que la reducción de Abeta mediante inmunización pasiva protege contra la pérdida progresiva de la degeneración sináptica en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer. (Buttini *et al.*, (2005) J. Neurosci. 25:9096-101).

Los recientes avances en la tecnología recombinante han permitido la producción de anticuerpos contra virtualmente cualquier diana, por ejemplo, células cancerosas, bacterias, y virus. Por lo general, un anticuerpo se produce mediante una línea celular que ha sido modificada por ingeniería genética para expresar el anticuerpo a niveles altos. La línea celular modificado por ingeniería genética se desarrolla posteriormente en un cultivo que comprende una mezcla compleja de azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, así como diversas proteínas, incluyendo por ejemplo, proteínas de suero. Sin embargo, separar los anticuerpos completos a partir de subproductos celulares y componentes del cultivo con una pureza suficiente para su uso en investigación o como productos terapéuticos plantea un tremendo desafío. La purificación de las moléculas de anticuerpos es especialmente crítico si los anticuerpos van a ser utilizados como un fármaco para la administración a seres humanos.

Los esquemas (o trenes) de purificación tradicionales de anticuerpos comprenden con frecuencia una etapa de cromatografía, que aprovecha la capacidad de la molécula de anticuerpo para ser retenida por o unirse preferentemente a la fase sólida (o fase sólida funcionalizada) de una columna de cromatografía en comparación con la unión o la retención de diversas impurezas. Se han propuesto o llevado a cabo esquemas para purificar anticuerpos que primero se unen a proteínas que contienen una región CH2/CH3 a Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida, seguido de la eliminación de las impurezas unidas a la fase sólida mediante el lavado de la fase sólida con un disolvente electrolito hidrófobo y la posterior recuperación de las proteínas que contienen una región CH2/CH3 desde la fase sólida. Sin embargo, estos sistemas están limitados en lo referente a que las condiciones utilizadas para unirse preferentemente a las proteínas que contienen una región CH2/CH3 también soportan la unión de las impurezas (por ejemplo, anticuerpos con regiones CH2/CH3 incompletas). En el desarrollo de la terapéutica humana, tales impurezas resultan muy poco deseables.

Por consiguiente, existe la necesidad de mejorar la purificación de proteínas o polipéptidos que tengan regiones constantes, en concreto, proteínas que tengan regiones Fc (por ejemplo, anticuerpos), producidas en cultivo celular.

El documento EE.UU. 2004/229330 describe un método para la purificación y captura de alta eficiencia de una proteína marcada a partir de una preparación de proteínas, especialmente una proteína marcada en baja cantidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención presenta métodos de purificación de anticuerpos que se unen a A β . Los métodos de la invención resultan especialmente adecuados para la purificación de anticuerpos desarrollados para su administración a seres humanos. En concreto, la invención presenta la purificación de anticuerpos anti-A β producidos en cultivo celular.

En diversos aspectos, la presente invención presenta métodos para separar un anticuerpo anti-A β , de un líquido de partida que comprende el anticuerpo y una o más impurezas. En los métodos de la invención, el anticuerpo que se une a A β se adsorbe a un agente de unión a Fc que comprende una o más de la Proteína A y la proteína G y a continuación el agente de unión a Fc se lava con una solución tampón que contiene CaCl₂ 0,5 M a 3,4 M para eliminar una o más impurezas. A continuación se recupera la proteína desde el agente de unión a Fc en una solución de elución de pH 2 a 4. Los métodos de la invención resultan especialmente útiles para eliminar impurezas tales como las especies de variantes de ultralectura de intrones (IRT), las especies con menos enlaces disulfuro (UDB) y/o las especies de variantes de bajo peso molecular (LMW). Los métodos de la invención también resultan eficaces para eliminar impurezas tales como ADN y proteínas de la célula hospedadora (HCP).

Los métodos de la presente invención comprenden una o más etapas de separación cromatográfica y además pueden comprender una o más etapas de filtración. Los etapas de separación cromatográfica pueden ser continuas o discontinuas (por ejemplo, un procedimiento por lotes), o una combinación de ambas. En diversas formas de realización, los métodos comprenden una o más etapas de filtración, por ejemplo, para eliminar los virus, concentrar y tamponar la solución que contiene la proteína diana, y para eliminar contaminantes microbianos.

En diversas formas de realización, el anticuerpo anti-A β es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-A β es un anticuerpo que se une específicamente al epítipo dentro de los restos 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 15-24, 16-24, 16-21, 19-22, 33-40, 33-42 de A β . Unos anticuerpos anti-A β ejemplares se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A β , tal como, por ejemplo, dentro de los restos 1-7, 1-5, 3-7 ó 3-6 de A β . Otros anticuerpos anti-A β ejemplares se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 13-28 de A β , tal como, por ejemplo, dentro de los restos 16-21 ó 19-22 de A β . Otros anticuerpos anti-A β ejemplares más se unen específicamente a un epítipo del extremo C-terminal de A β tal como, por ejemplo, 33-40 ó 33-42 de A β . En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-A β se une a un epítipo discontinuo que incluye los restos dentro de 1-7 y dentro de 13-28 de A β . Otras formas de realización presentan fragmentos Fab, Fab'(2) o Fv de anticuerpos anti-A β . En algunas de tales formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo creado mediante el proceso descrito en la publicación de patente internacional N° WO03/070760.

En una forma de realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-A β humanizado, y en determinadas formas de realización, es un anticuerpo anti-A β seleccionado del grupo que consiste en 3D6, 10D5, 12B4, 12A11, 15C11 y 266. El isotipo del anticuerpo puede ser IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o cualquier otro isotipo farmacéuticamente aceptable. En las formas de realización preferentes, el isotipo es IgG1 humana o IgG4 humana.

En diversas formas de realización, el anticuerpo que se une a A β se produce por recombinación. En diversas formas de realización, el anticuerpo que se une a A β se produce por recombinación en una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En diversas formas de realización, la una o más impurezas comprenden una o más de una proteína de la célula hospedadora, ADN de la célula hospedadora, una proteína de cultivo celular, una especie no deseada de la proteína de unión a A β , y mezclas de las mismas. Por ejemplo, en diversas formas de realización, las especies no deseadas de la proteína de unión a A β comprenden uno o más de cadenas de anticuerpos o fragmentos de las mismas que tienen una secuencia de ultralectura de intrones, uno o más de cadenas de anticuerpos o fragmentos de las mismas que tienen un enlace disulfuro incorrecto, un semi-anticuerpo o fragmento del mismo, un dímero de cadena ligera o fragmento del mismo, y un dímero de cadena pesada o fragmento del mismo.

Los métodos de la presente invención purifican un anticuerpo anti-A β , a partir un líquido de partida que comprende el anticuerpo y una o más impurezas adsorbiendo primero el anticuerpo a un agente de unión a Fc que comprende una o más de la Proteína A y la proteína G, seguido de lavado del agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl₂ 0.5MT a 3 M para eliminar una o más impurezas, y recuperar posteriormente el anticuerpo desde el agente de unión a Fc en un tampón de elución a pH 2 a 4. En diversas formas de realización, las etapas de adsorción del anticuerpo a un agente de unión a Fc y el lavado del agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl₂, se realizan a una temperatura en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 24°C.

El agente de unión a la región Fc comprende una o más de la Proteína A y la proteína G. En una forma de realización preferente, el agente de unión a Fc está inmovilizado sobre una fase sólida. Esta fase sólida puede comprender, por ejemplo, una o más de una perla, una matriz de agarosa, sílice, y mezclas de los mismos.

En diversas formas de realización, la solución tampón que contiene el CaCl_2 tiene un valor de pH en el intervalo comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9, y en algunas formas de realización, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,5 o entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Los valores y los intervalos incluidos y/o intermedios dentro de los intervalos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un valor de pH entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,9, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,9, entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 7,7, entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7, o entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9.

Además, los intervalos con los valores enumerados en el presente documento como límite superior o inferior pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un pH de al menos aproximadamente (o aproximadamente) 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, u 8.

La solución tampón tiene una concentración de CaCl_2 divalente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 3 M, entre aproximadamente 1,0 M y aproximadamente 3 M o entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 2,5 M. Por ejemplo, el tampón puede comprender CaCl_2 al menos aproximadamente 0,6 M, o CaCl_2 al menos aproximadamente 2 M. Los valores e intervalos incluidos y/o intermedios dentro de los intervalos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la solución tampón tiene una concentración de CaCl_2 entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,5 M y 1,0 M, entre aproximadamente 0,5 M y 2 M, entre aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 2,0 M, entre aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 2,5 M, entre aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 3,0 M, o entre aproximadamente 2,5 M y aproximadamente 3 M.

Además, los intervalos con los valores enumerados en el presente documento como límite superior o inferior pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la solución tampón tiene una concentración de CaCl_2 de al menos aproximadamente (o aproximadamente) 0,6 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, ó 3 M. En diversas formas de realización, la solución tampón que contiene CaCl_2 tiene una temperatura en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 24°C.

La etapa de recuperación del anticuerpo desde el agente de unión a Fc comprende eluir el anticuerpo utilizando un tampón de elución con un pH en el intervalo comprendido entre 2,0 y aproximadamente 4,0, más preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5. Los valores e intervalos incluidos y/o intermedios dentro de los intervalos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el tampón de elución tiene un pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 o entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4.

Además, los intervalos con los valores enumerados en el presente documento como límite superior o inferior pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el tampón de elución tiene un pH de al menos aproximadamente (o aproximadamente) 2, 2,5, 3, 3,5 ó 4.

En diversas formas de realización, los anticuerpos recuperados pueden someterse a etapas de purificación adicionales ya sea antes, o después de, la etapa de cromatografía del agente de unión a Fc. Por ejemplo, las etapas de purificación adicionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía con hidroxiapatita, diálisis, cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatofocalización, ultrafiltración, diafiltración, microfiltración, y filtración en gel. En diversas formas de realización, la etapa de cromatografía del agente de unión a Fc va seguida de una cromatografía de intercambio aniónico y una etapa de HIC. En diversas formas de realización, las etapas de cromatografía van seguidas adicionalmente de una etapa de filtración de virus, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y/o una etapa de filtración de contaminantes microbianos.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , a partir de una solución del mismo que contiene impurezas y recuperar posteriormente la proteína desde el agente de unión a Fc para producir una primera combinación de eluyentes.

En diversas formas de realización, el proceso de purificación continúa sometiendo la primera combinación de eluyentes a cromatografía de intercambio iónico poniendo en contacto una resina de intercambio iónico con la primera combinación de eluyentes de manera que el anticuerpo diana no se adsorba a la resina y recuperando el anticuerpo diana del flujo continuo para producir una segunda combinación de eluyentes. En diversas formas de realización, la etapa de cromatografía de intercambio iónico comprende adicionalmente lavar la resina de intercambio iónico con una solución de lavado tamponada para recuperar al menos una parte de cualquier anticuerpo diana adsorbido.

En diversas formas de realización, el proceso de purificación continúa sometiendo la segunda combinación de eluyentes a cromatografía de interacción hidrófoba adsorbiendo el anticuerpo diana a una resina de interacción hidrófoba (por ejemplo, una fase sólida funcionalizada con ligandos hidrófobos), lavando la resina de interacción hidrófoba con una solución de lavado tamponada con una fuerza iónica que prácticamente no eluye la proteína diana y recuperando la proteína diana purificada (por lo general utilizando un tampón de elución con una fuerza iónica lo suficientemente baja como para desorber la proteína diana desde la resina de interacción hidrófoba).

En las formas de realización preferentes de los diversos aspectos de la invención, el agente de unión a Fc está inmovilizado sobre una fase sólida, que se equilibra preferentemente con un tampón adecuado antes del contacto con el líquido de partida. La fase sólida es, preferentemente, una columna que comprende agarosa que inmoviliza el agente de unión a Fc. En diversas formas de realización, la columna se recubre con un reactivo, tal como glicerol, para disminuir o evitar la adherencia no específica a la columna.

En diversas formas de realización, los anticuerpos purificados mediante los métodos de la presente invención pueden formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y utilizarse para diversos usos diagnósticos, terapéuticos u otros usos conocidos para tales moléculas.

En diversos aspectos, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , a partir de una solución que contiene el anticuerpo y las variantes de ultralectura de intrones (IRT) del mismo. En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir los niveles de una o más especies de variantes de ultralectura de intrones en una preparación de anticuerpos. En diversas formas de realización, la proteína recuperada desde el agente de unión a Fc tiene un nivel de variantes de ultralectura de intrones que es al menos 5 veces inferior al nivel de variantes de ultralectura de intrones en el líquido de partida, y en algunas formas de realización al menos 10 veces inferior al nivel de variantes de ultralectura de intrones en el líquido de partida. En diversas formas de realización, las variantes de ultralectura de intrones comprenden menos de aproximadamente el 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2% ó 0,1% de las especies de dicha proteína en la solución que contiene dicha proteína recuperada desde el agente de unión a Fc.

En diversos aspectos, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , a partir de una solución que contiene la proteína y variantes de bajo peso molecular (LMW) de la misma. En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir los niveles de una o más especies de variantes de bajo peso molecular en una preparación de anticuerpos. En diversas formas de realización, la proteína recuperada desde el agente de unión a Fc tiene un nivel de variantes de bajo peso molecular que es al menos 5 veces inferior al nivel de variantes de bajo peso molecular en el líquido de partida, y en algunas formas de realización al menos 10 veces inferior al nivel de variantes de bajo peso molecular en el líquido de partida. En diversas formas de realización, las variantes de bajo peso molecular comprenden menos de aproximadamente el 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2% ó 0,1% de las especies de dicha proteína en la solución que contiene dicha proteína recuperada desde el agente de unión a Fc.

En diversos aspectos, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , a partir de una solución que contiene la proteína y variantes con menos enlaces disulfuro (UDB) de la misma. En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir los niveles de una o más especies de variantes con menos enlaces disulfuro en una preparación de anticuerpos. En diversas formas de realización, la proteína recuperada desde el agente de unión a Fc tiene un nivel de variantes con menos enlaces disulfuro que es al menos 5 veces inferior al nivel de variantes con menos enlaces disulfuro en el líquido de partida, y en algunas formas de realización al menos 10 veces inferior al nivel de variantes con menos enlaces disulfuro en el líquido de partida. En diversas formas de realización, las variantes con menos enlaces disulfuro comprenden menos de aproximadamente el 20%, 15%, 10%, 5%, 2% ó 1% de las especies de dicha proteína en la solución que contiene dicha proteína recuperada desde el agente de unión a Fc.

En otros aspectos, la presente invención proporciona un tren de purificación para llevar a cabo cualquiera de los métodos que comprenden al menos las etapas de adsorber primero el anticuerpo anti-A β a un agente de unión a Fc como se ha definido anteriormente, seguido de lavado del agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl₂ 0,5 M a 3 M para eliminar una o más impurezas, y recuperar posteriormente la proteína desde el agente de unión a Fc en un tampón de elución a pH 2 a 4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La *Figura 1* muestra las secuencias completas de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-A β 3D6 humanizado versión 2 (hu3D6.v2), SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. Las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (CDR), es decir, CDR1, CDR2, y CDR3 están, respectivamente, en las posiciones de resto 24-39, 55-61 y 94-102 (panel superior). Las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (CDR), es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 están, respectivamente, en las posiciones de resto 40-44, 50-65 y 99-108 (panel inferior). Los enlaces disulfuro intramoleculares predichos se ilustran mediante las conexiones de los restos de cisteína implicados. Las

cisteínas que se esperaban formasen enlaces disulfuro intermoleculares están subrayadas y se indica la conectividad. El sitio de consenso de N-glicosilación de la cadena pesada del anticuerpo se indica en cursiva en las posiciones de resto 299-301 (panel inferior). La lisina C-terminal de la cadena pesada predicha se muestra entre paréntesis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir adicionalmente la invención, puede resultar útil para su comprensión exponer las definiciones de determinados términos que se utilizan en el presente documento. Las definiciones expuestas en el presente documento han sido agrupadas solamente para facilitar la referencia y no a modo de limitación.

Definiciones relacionadas con las proteínas

La presente invención presenta métodos de purificación de anticuerpos que se unen a A β . En concreto, la invención presenta la purificación de anticuerpos, producidos en cultivo celular. En diversos aspectos, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , a partir de una solución que contiene el anticuerpo y una o más variantes ultraleídas del mismo, tales como, por ejemplo, variantes de ultralectura de intrones. En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir los niveles de una o más especies de variantes de ultralectura de intrones (IRT) en una preparación de anticuerpos. Las expresiones "variante de ultralectura de intrones", y "especies de variantes de ultralectura de intrones" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren al producto de un proceso en el que, durante la síntesis de la proteína de unión a A β , la elongación de la cadena polipeptídica es interrumpida antes de la transcripción de una región codificadora por un codón de terminación en el intrón antes de la región codificadora. El resultado es una variante de la proteína de interés (es decir, una variante de ultralectura de intrones) con uno o más dominios incompletos o faltantes. Tales intrones pueden contener más de un codón de terminación que da como resultado la posibilidad de producir varias variantes de ultralectura de intrones diferentes.

La expresión "variante con menos enlaces disulfuro" (o "UDB") se refiere a cualquier especie en la que falta al menos un enlace disulfuro. El enlace disulfuro que falta puede ser un enlace disulfuro intercatenario o un enlace disulfuro intracatenario o una combinación de los dos.

La expresión "especie de bajo peso molecular" o especie "LMW" se refiere a variantes de la proteína de unión a A β , por ejemplo, anticuerpos anti-A β , que incluyen una especie de proteína que consiste en una cadena pesada libre, una cadena ligera libre, una especie IRT, media molécula, y tres cuartos de molécula, o mezclas de las mismas.

La Proteína A es una proteína de pared celular de aproximadamente 42 kD en la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad (aproximadamente 10^{-8} M para la IgG humana) a la región Fc de los anticuerpos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "Proteína A" abarca la Proteína A recuperada desde una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida mediante síntesis (por ejemplo, mediante síntesis peptídica, mediante técnicas recombinantes, etc.), y variantes de la misma que conservan la capacidad de unirse a proteínas con una región CH2/CH3.

La proteína G es una proteína de pared celular de estreptococos del grupo G. La proteína G es receptor de Fc de tipo III que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos, en concreto, los anticuerpos IgG. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína G" abarca la proteína G recuperada desde una fuente nativa de la misma, la Proteína G producida mediante síntesis (por ejemplo, mediante síntesis peptídica, mediante técnicas recombinantes, etc.), y variantes de la misma que conservan la capacidad de unirse a proteínas con una región Fc.

Las expresiones "proteína β -amiloide", "péptido β -amiloide", " β -amiloide", "A β " y "péptido A β " se utilizan indistintamente en el presente documento.

La expresión "proteína de unión a A β ", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una proteína capaz de unirse específicamente al(a los) péptido(s) A β o al(a los) epítipo(s) dentro de dicho(s) péptido(s) A β , o que tiene una afinidad de unión apreciable por A β . En las formas de realización ejemplares, la proteína de unión a A β contiene una región Fc de manera que puede unirse a un agente de unión a Fc de acuerdo con los métodos de la invención.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (utilizados indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína de unión al antígeno que tiene una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica que consiste en dos cadenas ligeras y dos pesadas, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Las cadenas pesada y ligera están plegadas en dominios. El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos con injerto de CDR,

anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y anticuerpos monocatenarios (scFv). La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solamente una especie de un sitio de unión al antígeno capaz de reconocer y unirse a un epítipo concreto de un antígeno diana, por ejemplo, un(os) epítipo(s) de A β . De esta manera, una composición de anticuerpo monoclonal presenta por lo general una única afinidad y especificidad de unión por un antígeno diana concreto con el que inmunorreacciona. Los anticuerpos no humanos pueden "humanizarse" mediante las técnicas descritas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.225.539. En un método, se insertan CDR no humanas en una secuencia de consenso de la región estructural del anticuerpo o anticuerpo humano. A continuación pueden introducirse cambios adicionales en la región estructural del anticuerpo para modular la afinidad o la inmunogenicidad.

La expresión "anticuerpo anti-A β " pretende referirse a un anticuerpo que tiene especificidad de unión por un péptido A β de la proteína precursora del amiloide humana (APP). El péptido A β también se conoce en la técnica como péptido beta amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de aproximadamente 4 kD de 39-43 aminoácidos de la APP (A β ₃₉, A β ₄₀, A β ₄₁, A β ₄₂ y A β ₄₃, respectivamente). La expresión "anticuerpo anti-A β " pretende abarcar los anticuerpos que tienen especificidad de unión por cualquiera de estas formas de péptido A β . Los anticuerpos anti-A β específicos de interés incluyen, pero no se limitan a, 3D6, 10D5, 12B4, 12A11, 15C11 y 266, y las versiones humanizadas de los mismos. Se describen anticuerpos anti-A β ejemplares en la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/010.942, presentada el 6 de diciembre de 2001 (publicación de patente de EE.UU. N° 20030165496A1; véase también la publicación PCT N° WO 2002/46237A2); la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/388.389, presentada el 12 de marzo de 2003 (publicación de patente de EE.UU. N° 20040087777A1; véase también la publicación PCT N° WO 2004/080419A2); la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/388.214, presentada el 12 de marzo de 2003 (publicación de patente de EE.UU. N° 20040082762A1; véase también la publicación PCT N° WO 2003/077858A2); la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/858.855, presentada el 01 de junio de 2004 (publicación de patente de EE.UU. N° 20050118651A1; véase también la publicación PCT N° WO 2004/108895A2); y la solicitud de EE.UU. con N° de serie 11/304.986, presentada el 15 de diciembre de 2005 (publicación de patente de EE.UU. N° 2006165682; véase también el documento PCT/US05/45515);

Se describen anticuerpos anti-A β ejemplares adicionales en la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/226.435, presentada el 26 de febrero de 2001 (publicación de patente de EE.UU. N° 20040043418A1; véase también la publicación PCT N° WO 01/062801A2), la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/487.322, presentada el 14 de agosto de 2002 (publicación de patente de EE.UU. N° 20040192898A1; véase también la publicación PCT N° WO 03/416466A2); la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/476.265, presentada el 26 de abril de 2002 (publicación de patente de EE.UU. N° 20050090648A1; véase también la publicación PCT N° WO 02/088306A2); la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/497.475, presentada el 26 de abril de 2002; (publicación de patente de EE.UU. N° 20050142131A1; véase también la publicación PCT N° WO 02/088307A2); y la solicitud de EE.UU. con N° de serie 10/505.313, presentada el 20 de febrero de 2003; (publicación de patente de EE.UU. N° 20050169925; véase también la publicación PCT N° WO 03/070760A2).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse por medio de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y/o Fv. Se describen métodos para la construcción de fragmentos Fab, por ejemplo, en Huse, *et al.*, (1989) Science 246:1275-1281). Pueden producirse otros fragmentos de anticuerpo mediante técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado mediante la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab' generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (iv) fragmentos Fv. La expresión "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compete con el anticuerpo intacto del que proviene, por la unión específica al antígeno.

El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante lámina plegada β y/o enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan adicionalmente en el presente documento "constantes" o "variables", en base a la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de los diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de los diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los dominios "constantes" de la cadena ligera se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de la cadena pesada se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" en la cadena ligera se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de la cadena pesada se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

El término “región” también puede referirse a una parte o porción de una cadena de anticuerpo o dominio de cadena de anticuerpo (por ejemplo, una parte o porción de una cadena pesada o ligera o una parte o porción de un dominio constante o variable, tal como se definen en el presente documento), así como a partes o porciones más discretas de dichas cadenas o dominios. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada o los dominios variables de la cadena ligera y pesada incluyen “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR” intercaladas entre las “regiones estructurales” o “FR”, tal como se definen en el presente documento.

El término “conformación” se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, un anticuerpo, una cadena de anticuerpo, un dominio o una región del mismo. Por ejemplo, la expresión “conformación de la cadena ligera (o pesada)” se refiere a la estructura terciaria de una región variable de la cadena ligera (o pesada), y la expresión “conformación del anticuerpo” o “conformación del fragmento de anticuerpo” se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento del mismo.

La expresión “unión específica” de un anticuerpo se refiere a que el anticuerpo presenta una afinidad apreciable por un antígeno o epítipo concreto y, generalmente, no presenta reactividad cruzada significativa. En las formas de realización ejemplares, el anticuerpo no presenta reactividad cruzada (por ejemplo, no presenta reacción cruzada con péptidos no A β o con epítopos remotos o distantes en A β). Unión preferente o “apreciable” incluye la unión con una afinidad de al menos 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, o 10^{-10} M. Resultan más preferentes las afinidades superiores a 10^{-7} M, preferentemente superiores a 10^{-8} M. Los valores intermedios de los expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferente puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de 10^{-6} M a 10^{-10} M, preferentemente de 10^{-7} M a 10^{-10} M, más preferentemente de 10^{-8} M a 10^{-10} M. Un anticuerpo que “no presenta reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad no deseable (por ejemplo, una proteína, polipéptido, o péptido no deseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A β se unirá apreciablemente a A β pero no reaccionará significativamente con péptidos o proteínas no A β (por ejemplo, péptidos o proteínas no A β incluidos en las placas). Un anticuerpo específico para un epítipo concreto no presentará reacción cruzada significativa, por ejemplo, con epítopos remotos o diferentes en el mismo péptido o proteína. La unión específica puede determinarse de acuerdo a cualquier medio reconocido en la técnica para determinar tal unión. Preferentemente, la unión específica se determina de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o los ensayos de unión competitiva.

Aparte de las inmunoglobulinas o anticuerpos “biespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un “anticuerpo bifuncional” o “biespecífico” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny *et al*, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Un “antígeno” es una molécula (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato o molécula pequeña) que contiene un determinante antigénico al que se une específicamente un anticuerpo.

El término “epítipo” o la expresión “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo o inmunoglobulina (o fragmento de unión al antígeno de la misma). Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan por lo general al ser expuestos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden por lo general al ser tratados con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye por lo general al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Además de los anticuerpos anti-A β descritos anteriormente, otras proteínas de unión a A β incluyen proteínas de fusión de anticuerpo. Las expresiones “proteína de fusión de anticuerpo” y “fusión de anticuerpo” se refiere a una proteína de fusión que incluye la totalidad o una porción de un anticuerpo fusionado a al menos un polipéptido o una porción de proteína no-anticuerpo. La fusión se logra generalmente por ingeniería genética del gen que codifica dicha proteína. Las proteínas de fusión de anticuerpo ejemplares adicionales incluyen la porción de unión al receptor celular de un anticuerpo (incluyendo la región Fc) fusionada a la totalidad o a una parte de otra proteína biológica celular o soluble, por ejemplo un receptor (celular o soluble) o parte del mismo, una citoquina o porción de la misma, una enzima o porción de la misma, etc. En concreto, una proteína de fusión de anticuerpo de la invención puede comprender la región Fc de un anticuerpo fusionada a un polipéptido o porción de proteína no-anticuerpo que es capaz de unirse a A β .

La expresión “agente de unión a Fc” se refiere a una molécula que es capaz de unirse a la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) que incluye, pero no se limita a, una proteína del complemento, un receptor de Fc o una proteína proveniente de bacterias, tal como la Proteína A o la Proteína G, que tiene alta afinidad por la región Fc de un anticuerpo.

La expresión “región Fc” se refiere a una región C-terminal de un anticuerpo IgG, en concreto, la región C-terminal de la(s) cadena(s) pesada(s) de dicho anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, una región Fc se define por lo general por abarcar desde aproximadamente el resto de aminoácido Cys226 al extremo carboxilo-terminal de una(s) cadena(s) pesada(s) de la IgG.

Definiciones relacionadas con la cromatografía

La expresión “líquido de partida”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un líquido que contiene al menos una sustancia diana que se trata de purificar a partir de otras sustancias también presentes. Los líquidos de partida pueden ser, por ejemplo, soluciones acuosas, sistemas de disolventes orgánicos, o soluciones o mezclas de disolventes acuosos/orgánicos. Los líquidos de partida son con frecuencia soluciones o mezclas complejas que contienen muchas moléculas biológicas (tales como proteínas, anticuerpos, hormonas y virus), moléculas pequeñas (tales como sales, azúcares, lípidos, etc.) e incluso material particulado. Mientras que un líquido de partida típico de origen biológico puede comenzar como una solución o suspensión acuosa, también puede contener disolventes orgánicos utilizados en etapas de separación anteriores tales como extracciones, precipitaciones de disolvente, y similares. Los ejemplos de líquidos de partida que pueden contener sustancias biológicas valiosas susceptibles de purificación mediante diversas formas de realización de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un sobrenadante de cultivo de un biorreactor, una suspensión celular homogeneizada, plasma, fracciones de plasma, y leche.

La expresión “sustancia diana” o “proteína diana” o “anticuerpo diana” se refiere en el presente documento a la una o más proteínas de unión a Aβ deseadas, por ejemplo, anticuerpos anti-Aβ, a purificar a partir del líquido de partida. La sustancia diana puede estar presente en el líquido de partida como una suspensión o en solución.

El término “impurezas” se refiere a materiales en el líquido de partida que son diferentes de la(s) sustancia(s) diana y que se desea excluir del(de los) producto(s) de sustancia diana final(es). Las impurezas típicas incluyen ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo las especies de ultralectura de intrones, las especies de bajo peso molecular y las especies con menos enlaces disulfuro), péptidos, endotoxinas, virus y moléculas pequeñas.

El término “subproducto” incluye productos no deseados, que desvirtúan, o disminuyen la proporción de proteína terapéutica de la invención.

La expresión “especies de alto peso molecular” se refiere a complejos de proteínas que tienen un peso molecular que es superior a la proteína deseada de la invención. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, tales agregados son superiores a aproximadamente 150 kD.

La expresión “especies de bajo peso molecular” se refiere a proteínas, por ejemplo, productos de degradación, que tienen un peso molecular que es inferior a la proteína deseada de la invención. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, tales productos de degradación son inferiores a aproximadamente 150 kD.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “fase sólida” se refiere a una matriz no acuosa con la que interactúa una sustancia diana durante la purificación o a la que puede adherirse un agente de unión a Fc. Los materiales de fase sólida adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio, sílice (por ejemplo, gel de sílice), polisacáridos (por ejemplo, una matriz de polisacáridos) tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos tales como poliacrilamida, metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno tales como por ejemplo la resina Amberlite™ (disponible en el mercado en Rohm y Haas Chemical Co., Philadelphia, Pa). La fase sólida puede seleccionarse de entre cualquiera de los grupos de resinas comúnmente descritas como resinas de afinidad, de intercambio iónico y de captura de iones. La fase sólida puede ser, por ejemplo, una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas, o una combinación de las mismas. La fase sólida puede ser de carácter poroso o no poroso, y puede ser compresible o incompresible. En diversas formas de realización, la fase sólida es una matriz polimérica o una partícula o perla de agarosa. En diversas formas de realización, la fase sólida puede estar recubierta con un reactivo (tal como glicerol), por ejemplo, para evitar la adherencia no específica de impurezas a la fase sólida. Una fase sólida que se une a Fc solamente necesita poseer una química o un ligando asociado que permita que el agente de unión a Fc se adhiera a la superficie de la fase sólida. Los materiales de fase sólida preferentes serán físicamente y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación que incluye bombeo y filtración de flujo tangencial, y temperaturas, pH, y otros aspectos de los líquidos empleados.

“Ligando de afinidad” se refiere a un resto que se une selectivamente o preferencialmente a un componente del líquido de partida a través de una interacción específica con un sitio de unión del componente. En la presente invención, el ligando de afinidad (por ejemplo, un agente de unión a Fc) está inmovilizado por lo general en una fase sólida tal como una resina. Ejemplos de ligandos de afinidad que pueden unirse al soporte de resina para proporcionar resinas de cromatografía útiles en el proceso de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Proteína A, Proteína G, y sus análogos, que se unen selectivamente a una región Fc de la proteína. Los métodos

para unir ligandos de afinidad a materiales de soporte sólidos son bien conocidos en la técnica de purificación. Véanse, por ejemplo, los textos de referencia *Affinity Separations: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Paul Matejtschuk (Editor), Irl Pr: 1997; y *Affinity Chromatography*, Herbert Schott, Marcel Dekker, Nueva York: 1997.

5 “Resina de cromatografía de afinidad” o “resina de afinidad” se refiere a una resina de cromatografía que comprende un sustrato o fase sólida con ligandos de afinidad unidos a sus superficies.

10 “Resina de cromatografía de intercambio iónico” o “resina de intercambio iónico” se refiere a un soporte sólido al que están unidos covalentemente ligandos que llevan una carga positiva o negativa, y que por lo tanto tiene contraiones libres disponibles para el intercambio con los iones en una solución con la que se pone en contacto la resina de intercambio iónico.

15 “Resinas de intercambio catiónico” se refiere a una resina de intercambio iónico con ligandos cargados negativamente unidos covalentemente, y que por lo tanto tiene cationes libres para el intercambio con los cationes en una solución con la que se pone en contacto la resina. En la técnica se conoce una gran variedad de resinas de intercambio catiónico, por ejemplo, aquellas en las que los grupos unidos covalentemente son carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen CMC-celulosa, SP-Sephadex™, y Fast S-Sepharose™ (estas dos últimas se encuentran disponibles en el mercado en Pharmacia).

20 “Resinas de intercambio aniónico” se refiere a una resina de intercambio iónico con grupos cargados positivamente unidos covalentemente, tales como grupos amino cuaternarios. Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen celulosa DEAE, TMAE, QAE Sephadex™ y Fast Q Sepharose™ (estas dos últimas se encuentran disponibles en el mercado en Pharmacia).

25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “sal caotrópica” se refiere a una sal que comprende uno o más componentes iónicos que se encuentran en las posiciones inferiores de la serie liotrópica que son capaces de penetrar las capas de hidratación de las proteínas y se unen directamente a sus superficies. Esto interrumpe la asociación de cohidratación, favoreciendo la solubilización de las proteínas. Los ejemplos de sales caotrópicas incluyen, pero no se limitan a, sales de haluro de los elementos del Grupo II (por ejemplo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de bario, bromuro de calcio, bromuro de magnesio, bromuro de bario, yoduro de calcio, yoduro de magnesio, yoduro de bario).

30 Los ejemplos de sales de cationes divalentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de Mn^{2+} , Ni^{2+} o Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Ba^{2+} con tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), cloruro (Cl^-), y bromuro (Br^-); y combinaciones de los mismos.

35 En determinadas formas de realización, la sal de catión divalente comprende un catión divalente (por ejemplo, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} o Ba^{2+}). Las sales caotrópicas preferentes para su uso en los procesos destacados son $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $NiCl_2$. Después de la etapa de lavado de la sal de catión divalente, la proteína diana se eluye desde la matriz de cromatografía de afinidad.

40 Un “tampón” es una sustancia que, gracias a su presencia en la solución, aumenta la cantidad de ácido o álcali que debe añadirse para provocar el cambio de unidad en el pH. Una solución tamponada resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Las soluciones tamponadas para su uso con reactivos biológicos son generalmente capaces de mantener una concentración constante de iones hidrógeno de manera que el pH de la solución se encuentre dentro de un intervalo fisiológico. La expresión “pH fisiológico” se refiere al pH de la sangre de mamíferos (es decir, 7,38 o aproximadamente 7,4). Por lo tanto, un intervalo de pH fisiológico es de aproximadamente 7,2 a 7,6. Los componentes de tampón tradicionales incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases. Los tampones ejemplares para su uso en la purificación de moléculas biológicas (por ejemplo, moléculas de proteínas) incluyen los tampones zwitteriónicos o de “Good”, véase, por ejemplo, Good *et al.*, (1966) *Biochemistry* 5:467 y Good e Izawa (1972) *Methods Enzymol.* 24:62. Los tampones ejemplares incluyen, pero no se limitan a TES, MES, PIPES, HEPES, MOPS, MOPSO, TRICINE y BICINE.

55 El “tampón de equilibrado” del presente documento es un tampón utilizado para preparar el reactivo de unión a Fc, la fase sólida, o ambos, para la carga del líquido de partida que contiene la proteína diana. El tampón de equilibrado es preferentemente isotónico y tiene comúnmente un pH en el intervalo comprendido entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. El “tampón de carga” es un tampón utilizado para cargar el líquido de partida que contiene la proteína de unión a A β , por ejemplo, el anticuerpo anti-A β , y las impurezas sobre la fase sólida en la que está inmovilizado el agente de unión a Fc. Con frecuencia, los tampones de equilibrado y carga son el mismo. El “tampón de elución” se utiliza para eluir la proteína de unión a A β desde el agente de unión a Fc inmovilizado. Preferentemente, el tampón de elución tiene un pH bajo y por lo tanto interrumpe las interacciones entre el agente de unión a Fc y la proteína de interés. Preferentemente, el tampón de elución de pH bajo tiene un pH en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, lo más preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4. Ejemplos de tampones que controlan el pH dentro de este intervalo incluyen tampones de glicina, fosfato, acetato, citrato y amonio, así como combinaciones de estos. Los tampones preferentes son tampones de citrato y acetato, lo más preferente tampones de citrato sódico o acetato

sódico. Se contemplan otros tampones de elución que incluyen tampones de pH elevado (por ejemplo, los que tienen un pH de 9 o más) o tampones que comprenden un compuesto o composición tal como MgCl_2 (2 mM) para eluir la proteína de interés.

“Líquido de lavado” o “tampón de lavado” tal como se utiliza en el presente documento se refieren en el presente documento al líquido utilizado para arrastrar las impurezas desde la resina de cromatografía a la que se une la sustancia diana. Puede emplearse más de un líquido de lavado secuencialmente, por ejemplo, con líquidos de lavado sucesivos que tienen propiedades variables tales como el pH, la conductividad, la concentración de disolvente, etc., diseñados para disociar y eliminar diversos tipos de impurezas que se asocian de manera no específica con la resina de cromatografía.

“Líquido de elución” o “tampón de elución” se refiere en el presente documento al líquido que se utiliza para disociar la sustancia diana desde la resina de cromatografía después de haber sido lavada con uno o más líquidos de lavado. El líquido de elución actúa para disociar la sustancia diana sin desnaturalizarla de modo irreversible. Los líquidos de elución típicos son bien conocidos en la técnica de la cromatografía y puede tener concentraciones de sales más altas, análogos o ligandos libres de afinidad libres, u otras sustancias que promueven la disociación de la sustancia diana desde la resina de cromatografía. “Condiciones de elución” se refiere a las condiciones del proceso impuestas a la resina de cromatografía unida a la sustancia diana que disocian la sustancia diana desde la resina de cromatografía, tal como poner en contacto la resina de cromatografía unida a la sustancia diana con un líquido de elución o tampón de elución para producir tal disociación.

“Líquido de limpieza” o “tampón de limpieza” se refiere en el presente documento al líquido que se utiliza para lavar la resina de cromatografía después de la finalización del proceso de purificación. El líquido de limpieza puede contener un detergente, un agente de inactivación de virus, o concentraciones relativamente altas de sales, y puede tener un pH superior o inferior al de los líquidos utilizados durante el proceso de purificación. Su fin es descontaminar la resina de cromatografía para que quede lista para su reutilización. Los líquidos de limpieza típicos son bien conocidos en la técnica de la cromatografía.

“Líquido de almacenamiento” o “tampón de almacenamiento” se refiere en el presente documento al líquido en el que se suspende la resina de cromatografía entre usos. Los líquidos de almacenamiento, además de los iones de tamponamiento, también pueden contener microbicidas u otros conservantes. Tales líquidos de almacenamiento son bien conocidos en la técnica de la cromatografía.

En diversos aspectos, la presente invención presenta métodos para purificar anticuerpos anti-A β , desde un líquido de partida que comprende la proteína y una o más impurezas adsorbiendo la proteína a un agente de unión a Fc, seguido del lavado del agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl_2 0,5 M a 3 M para eliminar una o más impurezas, y recuperar posteriormente la proteína desde el agente de unión a Fc. Los agentes de unión a Fc son la Proteína A y la proteína G.

La presente invención presenta procesos para la purificación de anticuerpos anti-A β . Los procesos de purificación ejemplares incluyen una etapa de cromatografía de afinidad. La etapa de cromatografía de afinidad puede ser continua, discontinua, o una combinación de ambas. Por ejemplo, la etapa de cromatografía de afinidad puede realizarse como un proceso discontinuo, tal como, por ejemplo, un proceso por lotes. La cromatografía de afinidad es el proceso de adsorción bioselectiva y posterior recuperación de un compuesto diana desde un ligando inmovilizado. Este proceso permite la purificación altamente específica y eficaz del compuesto diana. El proceso requiere la utilización de un ligando adecuadamente selectivo (por ejemplo, un agente de unión a Fc) que se una al compuesto diana (por ejemplo, un anticuerpo anti-A β) generalmente con una constante de disociación en el intervalo comprendido entre 10^{-4} a 10^{-8} , al tiempo que permita la recuperación en condiciones moderadas. El ligando está inmovilizado generalmente sobre una matriz porosa de perlas que puede estar en forma de medio de adsorción discontinuo o relleno de columna.

Un agente de unión preferente es la Proteína A. La Proteína A se une a la región Fc de las inmunoglobulinas. La Proteína A consiste en seis regiones, cinco de las cuales se unen a la IgG. Se une con alta afinidad a las IgG₁, IgG₂ e IgG₄ humanas, así como a las IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de ratón. La Proteína A se une con afinidad moderada a las IgD, IgM, IgA e IgE humanas, así como a la IgG₁ de ratón. Como ligando de afinidad, la Proteína A está inmovilizada en una matriz de manera que estas regiones sean libres para unirse. Una molécula de Proteína A inmovilizada puede unirse a por lo menos dos moléculas de IgG. Las versiones nativa y recombinante de la Proteína A comparten una especificidad similar por la región Fc de la IgG. La Proteína A recombinante (rProteína A) puede modificarse por ingeniería genética para que incluya, por ejemplo, una cisteína C-terminal, y puede inmovilizarse por medio de acoplamiento tioéster a una matriz en fase sólida. Tal acoplamiento da como resultado una mayor capacidad de unión de la Proteína A.

Un agente de unión alternativo es la Proteína G. La Proteína G es específica para la IgG, uniéndose con alta afinidad por las IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ humanas, así como las IgG₁ e IgG₃ de ratón. La Proteína G PLUS tiene una afinidad moderada por la IgG₄ humana y las IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de ratón. La proteína G recombinante (rProteína

G) puede modificarse por ingeniería genética para suprimir la región de unión a la albúmina de la proteína nativa. La Proteína G recombinante contiene dos regiones de unión de Fc.

Un agente de unión alternativo es la Proteína A/G. La Proteína A/G es una proteína obtenida por ingeniería genética que combina los perfiles de unión a la IgG de la Proteína A y de la proteína G. Se trata de un producto de fusión génica secretado por una forma no patógena de *Bacillus*. La Proteína A/G contiene cuatro dominios de unión a Fc de la Proteína A y dos de la Proteína G. La Proteína A/G no es tan dependiente del pH como la Proteína A, pero por lo demás tiene las propiedades aditivas de la Proteína A y G.

La Proteína A/G se une a todas las subclases de IgG humana, especialmente adecuadas para la purificación de anticuerpos IgG policlonales o monoclonales cuyas subclases no han sido determinadas. Además, se une a la IgA, IgE, IgM, y (en menor medida) a la IgD. La Proteína A/G también se une bien a todas las subclases de IgG de ratón, especialmente adecuadas para la purificación de anticuerpos monoclonales de ratón de las subclases de IgG, sin interferencia por parte de las IgA, IgM y la albúmina de suero de ratón. (Véase, por ejemplo, Sikkema (1989) Amer. Biotech. Lab 7, 42). Las subclases individuales de anticuerpos monoclonales de ratón pueden tener mayor afinidad por la Proteína A/G quimérica que por la Proteína A o que por la Proteína G. (Véase, por ejemplo, Eliasson *et al.*, (1988) J. Biol. Chem. 263, 4323-4327.)

En la presente invención, el agente de unión a Fc inmovilizado (por ejemplo, la Proteína A) se lava con una solución de CaCl_2 para eliminar las impurezas. En concreto, se ha descubierto que las impurezas no deseables producidas como resultado de las tecnologías de expresión de anticuerpos recombinantes pueden eliminarse mediante una etapa de lavado con CaCl_2 .

Los métodos de la presente invención pueden incluir opcionalmente etapas de purificación posteriores a la cromatografía de afinidad y la etapa de lavado con CaCl_2 . Las etapas de purificación posteriores pueden incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico y/o una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Las etapas de cromatografía posteriores pueden ser continuas, discontinuas (por ejemplo, tal como un proceso por lotes), o una combinación de ambas. La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas en base a las diferencias entre la carga global de las proteínas. La proteína diana debe tener una carga opuesta a la del grupo funcional unido a la resina a fin de unirse. Por ejemplo, los anticuerpos, que generalmente tienen una carga global positiva, se unen bien a los intercambiadores de cationes, que contienen grupos funcionales cargados negativamente. Debido a que esta interacción es iónica, la unión debe tener lugar en condiciones de baja concentración iónica. La elución se consigue aumentando la fuerza iónica para romper la interacción iónica, o cambiando el pH de la proteína. Mientras que la cromatografía de intercambio iónico se basa en las cargas de proteínas para aislarlas, la cromatografía de interacción hidrófoba utilizan las propiedades hidrófobas de algunas proteínas. Los grupos hidrófobos de la proteína se unen a grupos hidrófilos de la columna. Cuanto más hidrófoba sea una proteína, con más fuerza se unirá a la columna. La etapa de HIC elimina, por ejemplo, las impurezas provenientes de la célula hospedadora (por ejemplo, ADN y otras especies relacionadas con productos de alto y bajo peso molecular). Las etapas de purificación adicionales pueden incluir etapas de eliminación de virus así como etapas de ultrafiltración y/o diafiltración, como se describe en el presente documento.

La proteína que contiene la región Fc es un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo que tiene una región Fc que se une a un receptor de Fc del agente de unión a Fc. El uso de la solución tampón que contiene un CaCl_2 para lavar el agente de unión a Fc permite una mayor eliminación de impurezas, tales como, por ejemplo, las variantes de ultralectura y fragmentos que contienen la región constante (incluyendo las especies LMW y UDB), de la proteína de interés (por ejemplo, la sustancia diana en el líquido de partida).

Los métodos de la presente invención comprenden una o más etapas de separación cromatográfica y además pueden comprender una o más etapas de filtración para separar un anticuerpo que se une a A β (la "proteína diana") de las impurezas en un líquido de partida.

Por ejemplo, el líquido de partida puede filtrarse, centrifugarse o procesarse de otro modo para eliminar los restos de partículas y similares antes de poner el contacto el líquido de partida con el agente de unión a Fc. Por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, las proteínas pueden producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio de cultivo. Si la proteína se produce intracelularmente, los restos de partículas, sean células hospedadoras o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando la proteína se secreta al medio, las células hospedadoras recombinantes pueden separarse del medio de cultivo celular, por ejemplo, por filtración de flujo tangencial.

En diversas formas de realización, el líquido de partida que contiene la proteína diana se pone en contacto con un agente de unión a Fc (preferentemente inmovilizado sobre una fase sólida y equilibrado con un tampón adecuado) de manera que la proteína diana se adsorba al agente de unión a Fc (por ejemplo, un agente de unión a Fc inmovilizado). El líquido de partida se pone en contacto con el agente de unión a Fc (por ejemplo, un agente de unión a Fc inmovilizado) en un tampón de carga que puede ser el mismo que el tampón de equilibrado. A medida que el líquido de partida que contiene las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína diana se adsorbe al agente de unión a Fc y las diversas otras impurezas (tales como proteínas de la célula hospedadora, cuando la proteína diana se produce en una célula hospedadora recombinante, u otras impurezas provenientes del proceso)

fluyen a través de o se unen inespecíficamente a la fase sólida. En diversas formas de realización, el agente de unión a Fc es la Proteína A, y el tampón de equilibrado puede ser Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5. Otros tampones de equilibrado adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., a concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 100 mM (por ejemplo, 10 mM, 20 mM, 50 mM, etc.), y concentraciones salinas fisiológicas (por ejemplo, aproximadamente NaCl 0,15 mM), y a un pH de 5,0-9,0.

La fase sólida es, preferentemente, una partícula o perla de agarosa (por ejemplo, Sepharose) para inmovilizar el agente de unión a Fc. En diversas formas de realización, la columna se recubre con un reactivo, tal como glicerol, para disminuir o evitar la adherencia no específica a la columna. En diversas formas de realización, el agente de unión a Fc es la Proteína A. La columna rmp Protein A Sepharose™ Fast Flow (FF), disponible en el mercado en Amersham Biosciences, es un ejemplo de columna de Proteína A adecuada para su uso en las metodologías presentadas.

A continuación se lava el agente de unión a Fc con una solución de lavado tamponada que contiene CaCl_2 para eliminar las especies de variantes de proteínas unidas a la fase sólida o al agente de unión a Fc. En concreto, se ha descubierto que el uso de la etapa de lavado con CaCl_2 puede eliminar una cantidad significativa de impurezas no deseables. Concretamente, se ha descubierto que las variantes de ultralectura de intrones, las variantes de bajo peso molecular y las variantes con menos enlaces disulfuro de un anticuerpo anti-A β pueden eliminarse mediante un lavado con CaCl_2 . Además, el ADN y las proteínas de la célula hospedadora (HCP) también pueden eliminarse mediante el lavado con CaCl_2 .

En diversas formas de realización, para eliminar las impurezas se utilizan soluciones de lavado además de la solución de lavado que contiene CaCl_2 . Por ejemplo, en diversas formas de realización se utiliza una solución de Tris 20 mM a 50 mM, NaCl 0,75 M a 2,0 M, pH 5,0-9,0, y/o una solución de Tris 10 mM, pH 7,5 para lavar el agente de unión a Fc antes de, después de, o antes y después de lavar el agente de unión a Fc con la solución de lavado que contiene la sal de catión divalente.

En diversas formas de realización, el CaCl_2 se añade preferentemente a una concentración entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 2,5 M a una solución tamponada con un pH en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, y preferentemente un pH en el intervalo comprendido entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Las concentraciones preferentes del CaCl_2 incluyen, pero no se limitan a, 0,6 M, 2,0 M y 2,5 M. Los tampones adecuados para este fin incluyen, pero no se limitan a, tampones de acetato o Tris a una concentración de 20 mM a 50 mM.

Después de la(s) etapa(s) de lavado, se recupera la proteína diana desde el agente de unión a Fc. Esto se consigue normalmente utilizando un tampón de elución adecuado. La proteína diana se eluye desde la columna utilizando un tampón de elución con un pH bajo, por ejemplo, en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, y preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5.

En diversas formas de realización, la proteína diana así recuperada puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y utilizarse para diversos usos diagnósticos, terapéuticos u otros usos conocidos para tales moléculas.

En diversas formas de realización, la preparación de la proteína diana eluida puede someterse a etapas de purificación adicionales después de la etapa de cromatografía del agente de unión a Fc. Por ejemplo, las etapas de purificación adicionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía con hidroxapatita, diálisis, cromatografía de afinidad (incluyendo la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), precipitación con sulfato de amonio, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatofocalización, ultrafiltración, diafiltración y filtración en gel. En diversas formas de realización, la etapa de cromatografía del agente de unión a Fc va seguida de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y de HIC. En diversas formas de realización, las etapas de cromatografía van seguidas adicionalmente de una etapa de filtración de virus, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa de filtración de contaminantes microbianos. En diversas formas de realización, estas etapas de purificación adicionales pueden llevarse a cabo antes de la etapa de cromatografía del agente de unión a Fc.

En diversas formas de realización, los métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , comienzan con la adsorción de la proteína diana a un agente de unión a Fc que comprende la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida, seguido del lavado del agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl_2 para eliminar una o más impurezas, y la posterior recuperación de la proteína a partir de la Proteína A para producir una primera combinación de eluyentes.

En diversas formas de realización, el proceso de purificación continúa sometiendo la primera combinación de eluyentes a cromatografía de intercambio aniónico poniendo en contacto una resina de intercambio aniónico con

la primera combinación de eluyentes de manera que las impurezas se adsorban a la resina, mientras que la proteína diana no se adsorbe a la resina. Por lo tanto, puede recuperarse la proteína diana desde el flujo continuo para producir una segunda combinación de eluyentes. En diversas formas de realización, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico comprende adicionalmente el lavado de la resina de intercambio aniónico con una solución de lavado tamponada para recuperar al menos una porción de la proteína diana adsorbida, que a continuación se combina con la segunda combinación de eluyentes. Como alternativa, puede ponerse en contacto la primera combinación de eluyentes con la resina de intercambio aniónico de tal forma que el anticuerpo se adsorba; permitiendo el flujo continuo de cualquier impureza, opcionalmente seguido de lavado y elución del anticuerpo adsorbido.

En diversas formas de realización, el proceso de purificación continúa sometiendo la segunda combinación de eluyentes a HIC adsorbiendo la proteína diana a una resina de interacción hidrófoba (por ejemplo, una fase sólida funcionalizada con ligandos hidrófobos), lavando la resina de interacción hidrófoba con una solución de lavado tamponada con una fuerza iónica que prácticamente no eluya la proteína diana, y recuperando la proteína diana (por lo general utilizando un tampón de elución con una fuerza iónica lo suficientemente baja para desorber la proteína diana desde la resina de interacción hidrófoba) en una tercera combinación de eluyentes. Como alternativa, puede ponerse en contacto la segunda combinación de eluyentes con la columna de HIC de tal manera que la proteína diana no se adsorba, recuperando la proteína diana del flujo continuo como una tercera combinación de eluyentes.

En diversas formas de realización, el proceso de purificación incluye una o más etapas de filtración, por ejemplo, para eliminar los virus, concentrar y tamponar la solución que contiene la proteína diana, y para eliminar los contaminantes microbianos.

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , desde un líquido de partida que comprende la proteína y una o más impurezas en el que las impurezas comprenden una o más variantes IRT. En una forma de realización, los métodos proporcionan aproximadamente una reducción de los niveles de variantes IRT de 2 a aproximadamente 20 veces los del líquido de partida. Preferentemente, los niveles de variantes IRT se reducen al menos 5 veces y más preferentemente los niveles de variantes IRT se reducen al menos 10 veces. Por ejemplo, en un líquido de partida (muestra de partida) tiene aproximadamente un 3%-5% de variantes de anticuerpos IRT (como porcentaje del total de especies en el líquido de partida) las especies de variantes de anticuerpos IRT pueden reducirse a entre aproximadamente un 0,3% y aproximadamente un 0,5%. En diversas formas de realización, las especies de variantes IRT se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido de partida para la preparación de una proteína, las variantes IRT se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1% como porcentaje del total de especies en el líquido de partida.

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , desde un líquido de partida que comprende la proteína y una o más impurezas en el que las impurezas comprenden una o más variantes LMW. En una forma de realización, los métodos proporcionan aproximadamente una reducción de los niveles de variantes LMW de 2 a aproximadamente 20 veces los del líquido de partida. Preferentemente, los niveles de variantes LMW se reduce al menos 5 veces y más preferentemente los niveles de variantes LMW se reducen al menos 10 veces. Por ejemplo, en un líquido de partida (muestra de partida) que tiene aproximadamente un 3%-5% de variantes de anticuerpos LMW (como porcentaje del total de especies en el líquido de partida) las especies de variantes de anticuerpos LMW pueden reducirse a entre aproximadamente un 0,3% y aproximadamente un 0,5%. En diversas formas de realización, las especies de variantes LMW se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido de partida para la preparación de una proteína, las variantes LMW se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1% como porcentaje del total de especies en el líquido de partida.

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-A β , desde un líquido de partida que comprende la proteína y una o más impurezas en el que las impurezas comprenden una o más variantes UDB. En una forma de realización, los métodos proporcionan una reducción de los niveles de variantes UDB de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces los del líquido de partida. Preferentemente, los niveles de variantes UDB se reduce al menos 5 veces, y más preferentemente los niveles de variantes UDB se reduce al menos 10 veces.

Por ejemplo, en un líquido de partida (muestra de partida) que tiene aproximadamente un 20% de variantes de anticuerpos UDB (como porcentaje del total de especies en el líquido de partida) las especies de variantes de anticuerpos UDB pueden reducirse a entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 2%. En diversas formas de realización, las especies de variantes UDB se reducen a: menos de un 20%, menos de un 15%, menos de un 10%, menos de un 5%, menos de un 2%, o menos de un 1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido de partida para la preparación de una proteína, las variantes UDB se reducen a: menos de un 20%, menos de un 15%, menos de un 10%, menos de un 5%, menos de un 2%, o menos de un 1% como porcentaje del total de especies en el líquido de partida.

Además, por ejemplo, en un líquido de partida (muestra de partida) que tiene aproximadamente un 3%-5% de variantes de anticuerpos UDB (como porcentaje del total de especies en el líquido de partida) las especies de variantes de anticuerpos UDB pueden reducirse a entre aproximadamente un 0,3% y aproximadamente un 0,5 %. En diversas formas de realización, las especies de variantes UDB se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido de partida para la preparación de una proteína, las variantes UDB se reducen a: menos de un 1%, menos de un 0,8%, menos de un 0,5%, menos de un 0,3%, menos de un 0,2%, y/o menos de un 0,1% como porcentaje del total de especies en el líquido de partida.

Proteínas de unión a A β para su uso en los métodos de purificación de la invención

Las proteínas de unión a A β , por ejemplo, los anticuerpos anti-A β , a purificar de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento, pueden prepararse mediante técnicas que están bien establecidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, técnicas de síntesis (tales como técnicas recombinantes y la síntesis peptídica o una combinación de estas técnicas), o pueden aislarse a partir de una fuente endógena de la proteína. En diversas formas de realización, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, una preparación de anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Las técnicas para la producción de anticuerpos se describen más adelante. En otras formas de realización, la proteína de unión a A β puede ser una proteína de fusión de anticuerpo que comprende una región Fc de anticuerpo fusionada a una porción de una proteína o polipéptido que es capaz de unirse a A β . La preparación de proteínas de fusión de anticuerpo también se describe más adelante.

Anticuerpos policlonales

Pueden prepararse anticuerpos policlonales inmunizando a un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título de anticuerpos en el sujeto inmunizado puede supervisarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mediante un antígeno diana inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el antígeno diana pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía con Proteína A-Sepharose para obtener el anticuerpo, por ejemplo, IgG, fracción. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-antígeno son más altos, pueden obtenerse del sujeto las células productoras de anticuerpos y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497) (véanse también, Brown *et al.*, (1981.) J. Immunol. 127:539-46; Brown *et al.*, (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh *et al.*, (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76:2927-31; y Yeh *et al.*, (1982) Int. J. Cancer 29:269-75). Para la preparación de anticuerpos policlonales quiméricos, véase Buechler *et al.*, patente de EE.UU. N° 6.420.113.

Anticuerpos monoclonales

Puede aplicarse cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas con el fin de generar un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, G. Galfre *et al.*, (1977) Nature 266:55052; Gefter *et al.*, Somatic Cell Genet, citado *supra*; Lerner, Yale J. Biol. Med., citado *supra*; Kenneth, Monoclonal Antibodies, citado *supra*). Además, el experto en la materia entenderá que existen muchas variaciones de tales métodos que también resultarían útiles. Por lo general, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden crearse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunógena de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferentes son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Puede utilizarse cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma como pareja de fusión de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en la ATCC. Por lo general, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esplenocitos de ratón mediante polietilenglicol ("PEG"). A continuación, las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan utilizando medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas y fusionadas infructuosamente (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan cribando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para los anticuerpos que se unen a un antígeno diana mediante un ensayo ELISA convencional.

Anticuerpos recombinantes

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal cribando una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos) con un antígeno diana para aislar de ese modo los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al antígeno diana. Los kits para

la generación y el cribado de bibliotecas de presentación en fagos están disponibles en el mercado (por ejemplo, el *Recombinant*

Phage Antibody System de Pharmacia, catálogo N° 27-9400-01; y el *SurfZAP™ Phage Display Kit* de Stratagene, catálogo N° 240612). Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos especialmente adecuados para su uso en la generación y el cribado de una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo en Ladner *et al.*, patente de EE.UU. N° 5.223.409; Kang *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 92/18619; Dower *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 91/17271; Winter *et al.*, publicación internacional PCT WO 92/20791; Markland *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 92/15679; Breitling *et al.*, publicación internacional PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 92/01047; Garrard *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 92/09690; Ladner *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 90/02809; Fuchs *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.*, (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.*, (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.*, (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:3576-3580; Garrard *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.*, (1991) *Nuc. Acid. Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:7978-7982; y McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Además, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que pueden crearse mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, se encuentran dentro del alcance de la invención.

La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o a un anticuerpo que incluye al menos una cadena de anticuerpo o inmunoglobulina humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de anticuerpo o inmunoglobulina (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina humana y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina no humana, e incluye adicionalmente regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de la cadena ligera humanizada" o "región variable de la cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región estructural variable sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina humana y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina no humana.

La expresión "sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina humana" o "sustancialmente humano/a" se refiere a que cuando se alinean con una secuencia de aminoácidos de anticuerpo o inmunoglobulina humana para fines de comparación, la región comparte al menos un 80%-90%, un 90%-95%, o un 95%-99% de identidad (es decir, identidad de secuencia local) con la secuencia de la región constante o región estructural humana, permitiendo, por ejemplo, para sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares. La introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares, se denomina con frecuencia "optimización" de una cadena o anticuerpo humanizado. La expresión "sustancialmente de un anticuerpo o inmunoglobulina no humana" o "sustancialmente no humano/a" se refiere a que tiene una secuencia de anticuerpo o inmunoglobulina idéntica en al menos un 80%-95%, preferentemente en al menos un 90%-95%, más preferentemente un 96%, 97%, 98%, ó 99% a la de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

Por consiguiente, todas las regiones o restos de un anticuerpo o inmunoglobulina humanizada, o de una cadena de anticuerpo o inmunoglobulina humanizada, salvo las CDR, son sustancialmente idénticas a las correspondientes regiones o restos de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. La expresión "región correspondiente" o "resto correspondiente" se refiere a una región o resto en un segundo aminoácido o secuencia de nucleótidos que ocupa la misma posición (es decir, equivalente) que una región o resto en un primer aminoácido o secuencia de nucleótidos, cuando las secuencias primera y segunda se alinean de manera óptima para fines de comparación.

La expresión "identidad significativa" se refiere a que dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 50%-60% de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 60%-70% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 80%-90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 90%-95% de identidad de secuencia, y aún más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99% de identidad de secuencia o más). La expresión "identidad sustancial" se refiere a que dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80%-90% de identidad

de secuencia, preferentemente al menos un 90%-95% de identidad de secuencia, y más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99% de identidad de secuencia o más). Para la comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se indican las coordenadas de subsecuencia, en caso necesario, y se indican los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencia calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa indicados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que resulta adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (accesible al público a través del servidor de internet del NCBI de los Institutos Nacionales de la Salud). Por lo general, pueden utilizarse los parámetros del programa por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden utilizarse parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915 (1989)).

Preferentemente, las posiciones de resto que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Para fines de clasificación de las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Preferentemente, los anticuerpos o inmunoglobulinas humanizadas se unen al antígeno con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro, o cinco de aquel del anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de 10^{-9} M, los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos 3×10^{-8} M, 4×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, ó 10^{-9} M. Se dice que una cadena de inmunoglobulina "dirige la unión al antígeno" cuando confiere a un anticuerpo o inmunoglobulina intacta (o fragmento de unión al antígeno de la misma) una afinidad de unión o propiedad de unión específica. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) influye sustancialmente en la capacidad de una cadena pesada o ligera para dirigir la unión al antígeno si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de un anticuerpo o inmunoglobulina intacta (o fragmento de unión al antígeno de la misma) que comprende dicha cadena en al menos un orden de magnitud en comparación con la del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación. Una mutación "no influye sustancialmente en (por ejemplo, disminuye) la capacidad de una cadena para dirigir la unión al antígeno" si influye en (por ejemplo, disminuye) la afinidad de unión de anticuerpo o inmunoglobulina intacta (o fragmento de unión al antígeno de la misma) que comprende dicha cadena en solamente un factor de dos, tres, o cuatro de la del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) que comprende una cadena equivalente que carece de dicha mutación.

La expresión "anticuerpo o inmunoglobulina quimérica" se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina cuyas regiones variables provienen de una primera especie y cuyas regiones constantes provienen de una segunda especie. Los anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas pueden construirse, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulinas pertenecientes a diferentes especies. Las expresiones "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no pretenden incluir anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas, como se define más adelante. Aunque los anticuerpos o inmunoglobulinas humanizadas son quiméricas en su construcción (es decir, comprenden regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (es decir, regiones variables que comprenden restos CDR del donante y restos de región estructural del aceptor) que no se encuentran en los anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas, tal como se definen en el presente documento.

Tales anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo mediante los métodos descritos en Robinson *et al.*, solicitud internacional N° PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.*, publicación internacional PCT N° WO 86/01533; Cabilly *et al.*, patente de EE.UU. N° 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente

5 europea 125.023; Better *et al.*, (1988) Science 240:1041-1043; Liu *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:3439-3443; Liu *et al.*, (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:214-218; Nishimura *et al.*, (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood *et al.*, (1985) Nature 314:446-449, y Shaw *et al.*, (1988) J. Natl. Cáncer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S.L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi *et al.*, (1986) BioTechniques 4:214; Winter, patente de EE.UU. 5.225.539; Jones *et al.*, (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven *et al.*, (1988) Science 239:1534, y Beidler *et al.*, (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Anticuerpos humanos de animales transgénicos y de presentación en fagos

10 Como alternativa, ya es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y con mutaciones en la línea germinal da como
15 resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana a tales ratones con mutaciones en la línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.150.584; N° 6.114.598; y N° 5.770.429.

20 También pueden obtenerse anticuerpos totalmente humanos de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)). También pueden obtenerse anticuerpos policlonales quiméricos de bibliotecas de presentación en fagos (Buechler *et al.*, patente de EE.UU. N° 6.420.113).

Anticuerpos biespecíficos y conjugados de anticuerpos

25 Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Tales anticuerpos pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)'2). Los métodos para crear anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la
30 coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de moléculas de anticuerpo diferentes (véase, el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

35 Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina u otra carga útil. Los anticuerpos heteroconjugados pueden crearse mediante cualquier método de entrecruzamiento conveniente. En la técnica son bien conocidos agentes de entrecruzamiento adecuados y se describen en la patente de
40 EE.UU. N° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

45 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede conjugarse, química o genéticamente, a una carga útil tal como un resto funcional, detectable o reactivo, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un conjugado de anticuerpos. Tales cargas útiles incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, agentes quimioterapéuticos y radioisótopos, todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

Proteínas de fusión de anticuerpo

50 Una proteína de unión a A β que tiene una región Fc tal como se utiliza en la invención puede ser una proteína de fusión que contiene al menos la porción Fc de un anticuerpo fusionada a un polipéptido o proteína no anticuerpo que es capaz de unirse a A β . Por lo tanto, se crea una proteína de fusión soluble que es capaz de unirse a A β y que tiene funciones relacionadas con Fc (tales como la estabilidad en suero, la unión al receptor de Fc y similares). Pueden prepararse, y han sido descritas en la técnica, proteínas de fusión de anticuerpo (también denominadas en la técnica proteínas de fusión Fc o proteínas de fusión Ig) mediante técnicas convencionales de
55 ADN recombinante, véase por ejemplo la patente de EE.UU. N° 5.116.964, la patente de EE.UU. N° 5.225.538, la patente de EE.UU. N° 5.336.603 y la patente de EE.UU. N° 5.428.130, todas de Capon *et al.*

Anticuerpos anti-A β

60 En general, los anticuerpos de la presente invención incluyen una variedad de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades amiloidogénicas, en concreto, la enfermedad de Alzheimer, dirigiéndolos contra el péptido A β .

65 Las expresiones "anticuerpo A β ", "anticuerpo anti-A β " y "anti-A β " se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se une a uno o más epítopos o determinantes antigénicos de la proteína precursora del amiloide humana (APP), la proteína A β , o ambas. Los epítopos o determinantes antigénicos

ejemplares pueden encontrarse dentro de la APP, pero se encuentran preferentemente dentro del péptido A β de la APP. Existen múltiples isoformas de la APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de la APP se les asignan números de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, el N° de acceso del GenBank P05067). Son ejemplos de isotipos específicos de APP que actualmente se sabe que existen en los seres humanos el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang *et al.*, (1987) Nature 325:733-736, que se indica como la APP “normal”; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte *et al.*, (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi *et al.*, (1988) Nature 331:528-530, y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi *et al.*, (1988) Nature 331:530-532. Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasa *in vivo* o *in situ*, la A β se encuentra tanto en una “forma corta”, de 40 aminoácidos de longitud, como en una “forma larga”, con una longitud de entre 42 y 43 aminoácidos. La forma corta, A β ₄₀, consiste en los restos 672-711 de la APP. La forma larga, por ejemplo, A β ₄₂ o A β ₄₃, consiste en los restos 672-713 ó 672-714, respectivamente. Parte del dominio hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxilo de la A β , y puede explicar la capacidad de la A β para agregarse, especialmente en el caso de la forma larga. El péptido A β puede encontrarse en, o purificarse a partir de, los fluidos corporales de seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo, incluyendo individuos normales e individuos que padecen de trastornos amiloidogénicos.

Las expresiones “proteína β -amiloide”, “péptido β -amiloide”, “ β -amiloide”, “A β ” y “péptido A β ” se utilizan indistintamente en el presente documento. El péptido A β (por ejemplo, A β ₃₉, A β ₄₀, A β ₄₁, A β ₄₂ y A β ₄₃) es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de la APP. El A β ₄₀, por ejemplo, consiste en los restos 672-711 de la APP y el A β ₄₂ consiste en los restos 672-713 de la APP. Los péptidos A β incluyen péptidos resultantes de la escisión de la APP por la secretasa y péptidos sintéticos que tienen la misma o esencialmente la misma secuencia que los productos de escisión. Pueden obtenerse péptidos A β a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares o fluidos corporales (por ejemplo suero o líquido cefalorraquídeo). Por ejemplo, puede obtenerse un A β a partir de células que expresan APP tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma estable con APP^{717V→F}, como se describe, por ejemplo, en Walsh *et al.*, (2002), Nature, 416, págs. 535-539. Puede obtenerse una preparación de A β a partir de fuentes de tejido mediante los métodos descritos anteriormente (véase, por ejemplo, Johnson-Wood *et al.*, (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:1550). Como alternativa, pueden sintetizarse péptidos A β mediante los métodos que son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Fields *et al.*, Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman y Co., Nueva York, NY, 1992, p. 77). Por lo tanto, los péptidos pueden sintetizarse mediante las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el grupo α -amino protegido por cualquiera de las químicas t-Boc o F-moc utilizando aminoácidos de cadena lateral protegida en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems Modelo 430A o 431. Pueden sintetizarse antígenos peptídicos más largos mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Por ejemplo, puede sintetizarse o clonarse molecularmente un polinucleótido que codifica el péptido o péptido de fusión e insertarse en un vector de expresión adecuado para la transfección y la expresión heteróloga mediante una célula hospedadora adecuada. El péptido A β también se refiere a secuencias A β relacionadas que son el resultado de mutaciones en la región A β del gen normal.

Pueden encontrarse epítopos o determinantes antígenicos ejemplares a los que se une un anticuerpo A β dentro de la proteína precursora del amiloide humana (APP), pero se encuentran preferentemente dentro del péptido A β de la APP. Los epítopos o determinantes antígenicos ejemplares dentro del A β se encuentran situados dentro del extremo N-terminal, la región central, o el extremo C-terminal de A β . Un “epítipo del extremo N-terminal”, es un epítipo o determinante antígeno situado dentro de, o que incluye, el extremo N-terminal del péptido A β . Epítopos del extremo N-terminal ejemplares incluyen los restos dentro de los aminoácidos 1-10 ó 1-12 de A β , preferentemente de los restos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-6, 2-7, 3-6 ó 3-7 de A β ₄₂. Otros epítopos del extremo N-terminal ejemplares se inician en los restos 1-3 y finalizan en los restos 7-11 de A β . Epítopos del extremo N-terminal ejemplares adicionales incluyen los restos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , los restos 3-5, 6, 7, 8 ó 9 de A β , o los restos 4-7, 8, 9 ó 10 de A β ₄₂. Los “epítopos centrales” son epítopos o determinantes antígenicos que comprende los restos situados dentro de la porción central o media del péptido A β . Epítopos centrales ejemplares incluyen los restos dentro de los aminoácidos 13-28 de A β , preferentemente de los restos 14-27, 15-26, 16-25, 17-24, 18-23 ó 19-22 de A β . Otros epítopos centrales ejemplares incluyen los restos dentro de los aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23 ó 19-24 de A β . Los epítopos o determinantes antígenicos “del extremo C-terminal” se encuentran situados dentro de o incluyendo el extremo C-terminal del péptido A β e incluyen los restos dentro de los aminoácidos 33-40, 33-41 ó 33-42 de A β . Los “epítopos del extremo C-terminal” son epítopos o determinantes antígenicos que comprende los restos situados dentro del extremo C-terminal del péptido A β (por ejemplo, dentro de aproximadamente los aminoácidos 30-40 ó 30-42 de A β). Determinantes antígenicos o epítopos del extremo C-terminal ejemplares adicionales incluyen los restos 33-40 ó 33-42 de A β .

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de los restos especificados, tales como los 3-7 de A β , lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos especificados (es decir, los 3-7 de A β en este un ejemplo). Tal anticuerpo no está necesariamente en contacto con cada resto dentro de los 3-7 de A β . Tampoco cada sustitución o delección de aminoácidos dentro de los 3-7 de A β influye necesariamente de manera significativa en la afinidad de unión. En diversas formas de realización, un anticuerpo A β es específico para el extremo. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “específico para el extremo” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a los restos N-terminal o C-terminal de un péptido A β pero que no reconoce los mismos restos cuando están presentes en una especie A β

más larga que comprende los restos o en la APP. En diversas formas de realización, un anticuerpo A β es "específico para el extremo C-terminal." Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "específico para el extremo C-terminal" se refiere a que el anticuerpo reconoce específicamente un extremo C-terminal libre de un péptido A β . Ejemplos de anticuerpos A β específicos para el extremo C-terminal incluyen aquellos que: reconocen un péptido A β que termina en el resto 40 pero no reconocen un péptido A β que termina en el resto 41, 42, y/o 43; reconocen un péptido A β que termina en el resto 42, pero no reconocen un péptido A β que termina en el resto 40, 41 y/o 43, etc.

En una forma de realización, el anticuerpo A β puede ser un anticuerpo 3D6 o una variante del mismo, o un anticuerpo 10D5 o una variante del mismo, ambos de los cuales se describen en la publicación de patente de EE.UU. N° 20030165496A1, la publicación de patente de EE.UU. N° 20040087777A1, la publicación de patente internacional N° WO02/46237A3 y la publicación de patente internacional N° WO04/080419A2. La descripción de los anticuerpos 3D6 y 10D5 también puede encontrarse, por ejemplo, en la publicación de patente internacional N° WO02/088306A2 y en la publicación de patente internacional N° WO02/088307A2. Anticuerpos 3D6 adicionales se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/303.478 y en la solicitud internacional N° PCT/US05/45614. El 3D6 es un anticuerpo monoclonal (AcMo) que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 1-5. En comparación, el 10D5 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos de 3-6. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 3D6 (RB96 3D6.32.2.4) fue depositada en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20108, EE.UU. el 8 de abril de 2003 conforme a los términos del Tratado de Budapest, y tiene el número de depósito PTA-5130. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 10D5 (RB44 10D5.19.21) fue depositada en la ATCC el 8 de abril de 2003 conforme a los términos del Tratado de Budapest, y tiene el número de depósito PTA-5129.

Son anticuerpos 3D6 variantes ejemplares aquellos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6. Otros anticuerpos 3D6 variantes ejemplares son aquellos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada expuesta como SEQ ID NO:7 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada expuesta como SEQ ID NO:8.

Son anticuerpos 10D5 variantes ejemplares aquellos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12. Otros anticuerpos 10D5 variantes ejemplares son aquellos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada expuesta como SEQ ID NO:13 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada expuesta como SEQ ID NO:14. Tales anticuerpos variantes se describen adicionalmente en el documento WO02/088307A2.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12B4 o una variante del mismo, como se describe en la publicación de patente de EE.UU. N° 20040082762A1 y en la publicación de patente internacional N° WO03/077858A2. El 12B4 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 3-7.

Son anticuerpos 12B4 variantes ejemplares aquellos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada (o cadena ligera) que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19.

En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12A11 o una variante del mismo, como se describe en la publicación de patente de EE.UU. N° 20050118651A1, la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 11/303.478, la publicación de patente internacional N° WO04/108895A2, y la solicitud de patente internacional con N° de serie PCT/US05/45614. El 12A11 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 3-7. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 12A11 fue depositada en la ATCC el 13 de diciembre de 2005, conforme a los términos del Tratado de Budapest, y tiene el número de depósito PTA-7271.

Son anticuerpos 12A11 variantes ejemplares aquellos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende la secuencia de la región variable de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:20 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, o SEQ ID NO:41.

En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 6C6, o una variante del mismo, tal como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/305.899 y en la solicitud internacional N° PCT/US05/45860. El 6C6 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado

en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 3-7. Una línea celular que produce el anticuerpo 6C6 fue depositada el 1 de noviembre de 2005, en la ATCC conforme a los términos del Tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso PTA-7200.

5 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 2H3 como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/305.899 y en la solicitud internacional N° PCT/US05/45860. El 2H3 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos de 2-7.

10 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 3A3 como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/305.899 y en la solicitud internacional N° PCT/US05/45860. El 3A3 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 3-7.

15 Las líneas celulares que producen los anticuerpos 2H3 y 3A3, que tienen los números de acceso de la ATCC PTA-7267 y PTA-7269, respectivamente, fueron depositadas el 13 de diciembre de 2005, conforme a los términos del Tratado de Budapest.

20 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 15C11 o una variante del mismo, como se describe en una solicitud de patente de EE.UU. N° 11/304.986 y en la solicitud de patente internacional N° PCT/US05/45515 titulada "Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide". El 15C11 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo central situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 19-22. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 15C11 fue depositada en la ATCC el 13 de diciembre de 2005, conforme a los términos del Tratado de Budapest, y tiene el número de depósito PTA-7270.

25 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 266 como se describe en la publicación de patente de EE.UU. N° 20050249725A1 y en la publicación de patente internacional N° WO01/62801A2. El 266 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo central situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 16-24. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal 266 fue depositada en la ATCC el 20 de julio de 2004, conforme a los términos del Tratado de Budapest, y tiene el número de depósito PTA-6123.

30 Son anticuerpos 266 variantes ejemplares aquellos que tienen, por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como SEQ ID NO:42 o SEQ ID NO:44 y una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable expuestas como la SEQ ID NO:43 o SEQ ID NO:45. Otros anticuerpos 266 variantes ejemplares son aquellos que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada expuesta como SEQ ID NO:46 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada expuesta como SEQ ID NO:47. Tales anticuerpos variantes se describen adicionalmente en la publicación de patente de EE.UU. N° 20050249725A1 y en la publicación de patente internacional N° WO01/62801A2.

35 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 2B1, o una variante del mismo, como se describe en una solicitud de patente de EE.UU. N° 11/305.899 y en la solicitud de patente internacional N° PCT/US05/45860 titulada "A β Antibodies for Use in Improving Cognition". El 2B1 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo central situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 19-23.

40 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 1C2, o una variante del mismo, como se describe en una solicitud de patente de EE.UU. N° 11/305.899 y en la solicitud de patente internacional N° PCT/US05/45860 titulada "A β Antibodies for Use in Improving Cognition". El 1C2 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo central situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 16-23.

45 En otra forma de realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 9G8, o una variante del mismo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/304.986 y en la solicitud de patente internacional N° PCT/US05/45515. El 9G8 es un AcMo que se une específicamente a un epítipo central situado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los restos 16-21.

50 Las líneas celulares que producen los anticuerpos 2B1, 1C2 y 9G8 fueron depositadas el 1 de noviembre de 2005, en la ATCC conforme a los términos del Tratado de Budapest y se les asignó los números de acceso PTA-7202, PTA-7199 y PTA-7201, respectivamente.

55 Los anticuerpos que se unen específicamente a los epítipos del extremo C-terminal situados en el péptido β -amiloide humano, para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el 369.2B, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.786.180, titulada "Monoclonal antibody 369.2B specific for β A4 peptide". Una descripción adicional de los anticuerpos para su uso en la presente invención puede encontrarse, por ejemplo, en Bussiere *et al.*, (Am. J. Pathol. 165(3):987-95 (2004)), Bard *et al.*, (PNAS 100(4):2023-8 (2003)), Kajkowski *et al.*, (J. Biol. Chem. 276(22):18748-56 (2001)), Games *et al.*, (Ann. NY Acad. Sci. 920:274-84 (2000)), Bard *et al.*, (Nat. Med.

6(8):916-9 (2000)), y en la solicitud de patente internacional N° WO03015691A2 titulada "Effecting rapid improvement of cognition in a subject having Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid angiopathy, or mild cognitive impairment, comprises administering anti-A beta antibody". Una descripción adicional de fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención puede encontrarse, por ejemplo, en Bales *et al.*, (Resumen P4-396, página S587, presentado en la Poster Session P4: Therapeutics and Therapeutic Strategies-Therapeutic Strategies, Amyloid-Based) y en Zameer *et al.*, (Resumen P4-420, página S593, presentado en la Poster Session P4: Therapeutics and Therapeutic Strategies-Therapeutic Strategies, Amyloid-Based).

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden producirse mediante síntesis o por recombinación. Por ejemplo, el anticuerpo puede producirse mediante un proceso de cultivo celular recombinante, utilizando, por ejemplo, células CHO, células NIH 3T3, células PER.C6®, células NS0, células VERO, fibroblastos de embrión de pollo, o células BHK. Además, la presente invención contempla los anticuerpos con modificaciones menores que conservan la propiedad funcional primaria de unión al péptido Aβ. En una forma de realización concreta, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado 3D6 anti-péptido Aβ que se une selectivamente al péptido Aβ. Más concretamente, el anticuerpo humanizado 3D6 anti-péptido Aβ se diseña para unirse específicamente a un epítipo del extremo NH₂-terminal, por ejemplo, los restos de aminoácidos 1-5, situados en el péptido β-amiloide 1-40 ó 1-42 humano encontrado en depósitos de placas en el cerebro (por ejemplo, en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer).

Un anticuerpo humanizado anti-péptido Aβ ejemplar es un 3D6 humanizado versión 2 (h3D6v2). Las secuencias completas de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de h3D6v2 predichas a partir de las secuencias de ADN de los vectores de expresión correspondientes se muestran en la Figura 1 (en la que los restos se numeran comenzando por el extremo NH₂-terminal de las cadenas ligera y pesada como resto número 1) y en la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. El último resto de aminoácidos codificado por la secuencia de ADN de la cadena pesada, Lys⁴⁴⁹, no se ha observado en la forma madura, la forma secretada de h3D6v2 y, sin ánimo de limitarse a ninguna teoría en particular, se supone que se elimina durante el procesamiento intracelular por proteasas celulares de CHO. Por lo tanto, el extremo COOH-terminal de la cadena pesada de h3D6v2 es opcionalmente Gly⁴⁴⁸. Se ha observado el procesamiento de la lisina del extremo COOH-terminal en anticuerpos provenientes del plasma y recombinantes y no parece afectar a su función (Harris (1995) J. Chromatogr. A. 705:129-134). El h3D6v2 purificado se modifica postraduccionalmente por adición de glicanos ligados a N a la porción Fc de la cadena pesada, que se sabe contiene un único sitio de consenso de N-glicosilación. El sitio de N-glicosilación presenta tres estructuras principales de oligosacáridos neutros de dos antenas complejos, observadas comúnmente en el sitio de N-glicosilación análogo de las proteínas IgG de mamíferos.

Otro anticuerpo humanizado anti-péptido Aβ ejemplar es el 3D6 humanizado versión 1 (hu3D6v1) que tiene la secuencia expuesta en la Figura 1, pero para una sustitución D→Y en la posición 1 de la cadena ligera, una sustitución S→A en la posición 75 de la cadena pesada (posición 74 según la numeración de Kabat), una sustitución T→S en la posición 78 de la cadena pesada (posición 77 según la numeración de Kabat), y una sustitución V→L en la posición 93 de la cadena pesada (posición 89 según la numeración de Kabat),

Los diversos aspectos y formas de realización de la presente invención se describen adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos. Los ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente a efectos ilustrativos. Los ejemplos se proporcionan utilizando dos anticuerpos monoclonales anti-Aβ diferentes. Se describen seis experimentos separados, que representa cada uno una combinación de extracción de anticuerpos e impurezas.

Materiales y Métodos

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, la tecnología de las inmunoglobulinas), y técnicas convencionales de electroforesis. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992). Bousse *et al.*, Protein Sizing on a Microchip, *Anal. Chem.* 73, 1207-1212 (2001); Knapp *et al.*, Commercialized and Emerging Lab-on-a-Chip Applications; En: *Proceedings of the μTAS 2001 Symposium*, Ramsey, J.M. y Van den Berg, A., 7-10 (2001); y Mhatre *et al.*, Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13(24) 2503-2510 (1999).

Producción del anticuerpo diana

El anticuerpo diana puede producirse, por ejemplo, utilizando una línea celular recombinante de mamífero desarrollada en un cultivo en suspensión. El medio acondicionado que contiene el anticuerpo de interés se genera en un biorreactor de producción. El producto resultante puede cosecharse y aclararse con cualquier etapa de aclarado apropiada tal como, por ejemplo, microfiltración y filtración de 0,22 µm o centrifugación, o filtración por lecho o filtración de 0,22 µm.

Purificación del anticuerpo diana

La purificación de los anticuerpos monoclonales diana ejemplificados en el presente documento (AAB o 12A11) consiste en la captura de la molécula diana en la cromatografía de afinidad con Proteína A. Esto puede consistir en rmp Protein A Sepharose™ Fast Flow, Protein A Sepharose™ Fast Flow, o MabSelect Protein A. A continuación se lava la resina como se describe para cada uno de los experimentos y el producto se eluye y se somete a ensayo para determinar los niveles de impurezas.

Análisis del anticuerpo diana

Para cuantificar la cantidad de IRT presente en las muestras de anticuerpo monoclonal AAB, se utilizó la HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Para determinar el porcentaje de especies de proteína monomérica (IgG monomérica), de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW), se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Para determinar la cantidad relativa de especies con menos enlaces disulfuro (UDB) en las muestras se llevó a cabo un análisis SEC-HPLC desnaturalizante. Los niveles de HCP en las muestras de ensayo se determinaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Ensayos analíticos: IRT y UDB

HPLC de fase inversa (Análisis IRT de AAB)

La RP-HPLC se llevó a cabo de la siguiente manera. Se realizó la reducción disulfuro de cada muestra por incubación a 40°C durante 60 minutos en presencia de DTT 2,5 mM. Se realizó la alquilación por incubación a temperatura ambiente en presencia de ácido yodoacético 5,5 mM. Después de la reducción y la alquilación, se inactivaron todas las muestras con 5 µl de DTT 1 M. El límite de cuantificación para este ensayo es de 0,5%. Se inyectaron aproximadamente 40 µg de cada muestra reducida y alquilada en una columna de RP-HPLC POROS R1/H y se procesaron durante 70 minutos en las siguientes condiciones:

Columna: POROS RI/H RP-HPLC
Temperatura de la columna: 50°C
Fase móvil A: TFA al 0,1% (p/v) en agua;
Fase móvil B: TFA al 0,1% (p/v) en acetonitrilo al 95%;
Caudal: 1,0 ml/min
Detección: 217 nm
Tiempo de ciclo: 70 minutos
Inyección: por triplicado de 40 µg cada una

Los tiempos de gradiente se enumeraron como en la TABLA 1.

Tabla 1: Tiempos de gradiente para el método RP-HPLC

Tiempo de gradiente	% de A	% de B
0-1	95	5
2	70	30
54	60	40
55,1-70	95	5

dSEC-HPLC (Análisis UDB de AAB)

La SEC-HPLC desnaturalizante se llevó a cabo de la siguiente manera. El pretratamiento de las muestras para el ensayo SEC desnaturalizante implica una mezcla de reactivo/muestra a unas concentraciones finales de 200 µg/ml de proteína, guanidina HCl 3 M, y Tris 100 mM, a un pH de 7,4. Las muestras se calentaron a 80°C durante 20 minutos mientras se mezclaban por inversión. Para este ensayo, se emplean dos testigos para permitir un agrupamiento de los niveles de UDB. Como testigos se utilizaron las referencias internas con niveles bajos y altos de UDB.

Las condiciones cromatográficas/de ensayo fueron las siguientes:

Columna: Tosoh BioSep G3000 SWXL
Temperatura de la columna: Ambiente

Fase móvil: guanidina HCl 3 M, NaPO₄ 25 mM, pH 6,8
 Gradiente: isocrático
 Caudal: 0,5 ml/min
 Detección: 280 nm
 Tiempo de ciclo: 50 minutos
 Inyección: por triplicado 50 µl (10 µg)

EJEMPLO 1: Comparación de los tampones de lavado para la eliminación de IRT

En este ejemplo, se purificó una solución impura que contenía el anticuerpo monoclonal anti-Aβ AAB por adsorción sobre una columna de Proteína A seguido de un primer lavado con un tampón de lavado que contenía CaCl₂, MgCl₂, NaCl o propilenglicol. Se purificó a pequeña escala el cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal, utilizando una columna rmp Protein A Sepharose™ FF (8,9 ml) conectada a un sistema de cromatografía GE Healthcare ÄKTA FPLC. Para todas las etapas de cromatografía rmp Protein A Sepharose™ FF descritas en el experimento 1, se utilizaron las siguientes condiciones. (Las excepciones se indican en las descripciones experimentales individuales).

Dimensiones de la columna - 1,0 cm x 11,4 cm
 Caudal operativo - 150 cm/hr
 Equilibrado 1 - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado abundante - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (1 volumen de columna)
 Lavado 1 - Variable (Véase la Tabla 2) excepto para el ciclo nº 1, que no tuvo Lavado 1
 Lavado 2 - Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 3 - Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)
 Elución - Glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)
 Regeneración 1 - citrato sódico 20 mM, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 Regeneración 2 - guanidina HCl 6 M (2 volúmenes de columna)
 Lavado de regeneración - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento - Etanol al 16% (5 volúmenes de columna)
 Temperatura del ciclo: 2°C-8°C

Los ciclos de columna rmp Protein A Sepharose™ FF se equilibraron con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. La columna se cargó a aproximadamente 10 mg de producto/ml de resina. La carga fue seguida de lavado abundante de 1 volumen de columna con de tampón de equilibrado y 5 volúmenes de columna con la solución de Lavado 1. Todas las soluciones de Lavado 1 sometidas a ensayo se esbozan en la Tabla 2. El Lavado 1 se incluyó en todas los ciclos excepto para el ciclo nº 1. El Lavado 1 fue seguido de 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 y 7 volúmenes de columna de Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5. El anticuerpo monoclonal se eluyó desde la columna con glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,1. A continuación se neutralizó la combinación de productos a 7,9-8,1 con Tris 2 M pH 8,5. A continuación las columnas se regeneraron, se lavaron y se almacenaron. La Tabla 2 enumera los niveles de las especies IRT y LMW presentes en las combinaciones de productos de los diversos ciclos. Los lavados con cloruro de magnesio y cloruro de calcio redujeron los niveles de las especies IRT y LMW.

Tabla 2: Valores de IRT y LMW para diversos tampones de Lavado 1

nº de ciclo	Condición	% de LMW	% de IRT
1	Testigo (sin Lavado 1)	4,4	2,5
2	Propilenglicol al 20%, pH 7,5	4,7	2,5
3	Tris 50 mM, cloruro de magnesio 2,0 M, pH 7,5	1,6	1,5
4	Tris 50 mM, cloruro de magnesio 2,5 M, pH 7,5	1,5	1,3
5	Acetato 50 mM, cloruro de magnesio 2,0 M, pH 4,5	0,9	0,8
6	Tris 50 mM, cloruro sódico 4,0 M, pH 7,5	4,4	2,5
7	Tris 50 mM, cloruro de calcio 2,0 M, pH 7,5	1,8	1,4
8	Tris 50 mM, cloruro de calcio 2,5 M, pH 7,5	0,8	0,8

Los resultados mostraron que los lavados con cloruro de magnesio y cloruro de calcio reducían los niveles de las especies IRT y LMW, mientras que los lavados con cloruro sódico y propilenglicol no reducían las especies IRT o LMW.

EJEMPLO 2: Cromatografía con Proteína A con lavado con CaCl₂ para la eliminación de IRT

En este ejemplo, se llevó a cabo una purificación de anticuerpo a mayor escala mediante cromatografía con Proteína A con un lavado con CaCl₂ para eliminar las especies IRT.

Se purificó a escala piloto el cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal utilizando una columna MabSelect Protein A (2,4 l) conectada a un sistema de cromatografía Millipore K-Prime 400. Los dos ciclos de MabSelect se realizaron como se describe a continuación.

- 5 Dimensiones de la columna - 13 cm x 18 cm
 Caudal operativo - 150 cm/hr, 300 cm/hr
 Equilibrado 1 - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado abundante - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (2 volúmenes de columna)
 Lavado 1 - Tris 50 mM, CaCl_2 2 M pH 7,5 para el ciclo nº 1 y sin Lavado 1 para el ciclo nº 2
 10 Lavado 2 - Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 3 - Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Elución - Glicina 50 mM, NaCl 25 mM, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)
 Regeneración 1 - glicina 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 Regeneración 2 - guanidina HCl 6 M (2 volúmenes de columna).
 15 Lavado de regeneración - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento - Etanol al 16% (5 volúmenes de columna)
 Temperatura del ciclo: 2°C-8°C

20 La columna MabSelect Protein A se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. A continuación se cargaron las columnas a aproximadamente 10 mg de producto/ml de resina. Esto fue seguido de lavado abundante de 2 volúmenes de columna con tampón de equilibrado y 5 volúmenes de columna de solución de Lavado 1. Esta solución de Lavado 1 consistía en Tris 50 mM, CaCl_2 2,0 M, pH 7,5 para el ciclo 1, mientras que se omitió completamente para el ciclo 2. A continuación, el Lavado 1 fue seguido de 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 y 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5. El
 25 anticuerpo monoclonal se eluyó desde la columna MabSelect Protein A con glicina 50 mM, NaCl 25 mM, pH 3,1. A continuación, se neutralizó la combinación de productos a 7,8-8,2 con Tris 2 M pH 8,5. A continuación, las columnas se regeneraron, se lavaron y se almacenaron. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Niveles de % de IRT en ciclos a escala piloto con y sin lavado con cloruro de calcio

Nº de ciclo	Tampón de Lavado 1	% de IRT
1	Tris 50 mM, CaCl_2 2 M, pH 7,5	0,8
2	Testigo (Ninguno)	1,9

35 Los resultados mostraron que a escala piloto el lavado con cloruro de calcio eliminaba la IRT de la combinación de productos.

EJEMPLO 3: Eliminación de ADN

40 En este ejemplo, se examinó la capacidad de un lavado con CaCl_2 para eliminar el ADN de la célula hospedadora desde una preparación que contenía el anticuerpo monoclonal AAB.

Se purificó a pequeña escala el cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal, utilizando una columna MabSelect Protein A (19 ml) conectada a un sistema de cromatografía GE Healthcare ÄKTA FPLC. Los tres ciclos de MabSelect se realizaron como se describe a continuación.

- 45 Dimensiones de la columna - 1,1 cm x 20 cm
 Caudal operativo - 300 cm/hr
 Equilibrado 1 - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado abundante - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (2 volúmenes de columna)
 50 Lavado 1 - Tris 50 mM, CaCl_2 2,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna) (Ciclos 2 y 3 solamente)
 Lavado 2 - Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna) (Ciclos 1 y 3 solamente)
 Lavado 3 - Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)
 Elución - Glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,0 (6 volúmenes de columna)
 Regeneración - glicina 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 55 Lavado de regeneración - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento - Etanol al 16% (5 volúmenes de columna)
 Temperatura del ciclo: 18°C-24°C

60 Los ciclos de columna MabSelect Protein A se equilibraron con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. A continuación se cargaron las columnas a una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. Esto fue seguido de lavado abundante de 2 volúmenes de columna con tampón de equilibrado. Para los ciclos 2 y 3, esta etapa fue seguida de 5 volúmenes de columna de solución de Lavado 1. Para los ciclos 1 y 3, se utilizaron 5 volúmenes de columna de solución de Lavado 2. Los 3 ciclos emplearon 7 volúmenes de columna de solución de Lavado 3. El anticuerpo monoclonal se eluyó desde la columna MabSelect Protein A con glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,0. A continuación, se neutralizó la combinación de productos a 7,5-8,0 con Tris
 65

2 M pH 8,5. A continuación, las columnas se regeneraron, se lavaron y se almacenaron. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Eliminación de ADN con lavado con cloruro de calcio

nº de ciclo	Lavado 1	Lavado 2	ADN (ng/ml)	ADN (ppm)
1	Ninguno (testigo)	Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5	3,6	0,37
2	Tris 50 mM, CaCl ₂ 2 M, pH 7,5	Ninguno	0,9	0,09
3	Tris 50 mM, CaCl ₂ 2 M, pH 7,5	Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5	0,3	0,03

reducción 10 veces mayor de ADN en comparación con el uso de NaCl en la solución de lavado.

EJEMPLO 4: Eliminación de proteínas de la célula hospedadora

En este ejemplo, se utilizó un segundo anticuerpo monoclonal anti-AB, 12A11, en los ciclos de purificación en los que se sometieron a ensayo diversas condiciones de lavado para determinar la capacidad para eliminar las proteínas de la célula hospedadora (HCP).

Se realizó un cribado de alto rendimiento (HTS) en un formato de placa de filtro de 96 pocillos para identificar las mejores condiciones de lavado para la eliminación de impurezas tales como HCP para la etapa de MabSelect. Este cribado variaba los excipientes de lavado, la concentración de excipiente, y el pH para determinar su efecto sobre las impurezas relacionadas con el proceso tales como las HCP.

La resina MabSelect se equilibró mediante Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7,3 y se cargó con el producto en una columna. A continuación se descompactó la resina, se mezcló y se distribuyeron 50 µL de resina a cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos. Se equilibró la resina de cada pocillo en solución de Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7,3, y a continuación se lavó con cada una de las diversas soluciones de lavado con excipientes en 3 etapas, utilizando cada una 300 µl de tampón de lavado. Después del lavado con excipientes, se realizó un segundo lavado con tampón de Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7,3 en 4 etapas de 300 µl cada una. A continuación se eluyó el producto desde la resina en 3 etapas de 300 µl cada una. Las etapas de elución 1 y 2 se combinaron y sometieron a ensayo para determinar los niveles de HCP.

Volumen de resina - 50 µl

Excipientes de lavado - cloruro sódico, cloruro de calcio, cloruro de magnesio,

Concentraciones de los excipientes - 100, 250, 500, 1.000, 1.500, y 2.000 mM

pH de los excipientes - 6,0 y 7,5

Tampones de elución - Hepes 25 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0, Hepes 25 mM, NaCl 100 mM, pH 3,0, glicina 50 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0, glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3,0 y arginina 100 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0, arginina 100 mM, NaCl 100 mM, pH 3,0

Temperatura del ciclo: 18°C-24 °C

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

Tabla 5: Valores de HCP para la resina MabSelect lavada con cloruro sódico, cloruro de calcio, o cloruro de magnesio a pH 6,0

Tampón de elución	Conc. de NaCl de elución (mM)	Conc. de excipiente de lavado (mM)	Excipiente de lavado		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
Glicina 50 mM	10	100	46.800	28.500	30.800
HEPES 25 mM		250	35.300	17.900	22.000
arginina 100 mM		500	40.900	17.700	18.400
Glicina 50 mM		1000	34.300	12.600	14.200
HEPES 25 mM		1500	37.000	7.800	10.700
arginina 100 mM		2000	43.900	5.800	9.300

Tabla 6: Valores de HCP para la resina MabSelect lavada con cloruro sódico, cloruro de calcio, o cloruro de magnesio a pH 7,5

Tampón de elución	Conc. de NaCl de elución (mM)	Conc. de excipiente de lavado (mM)	Excipiente de lavado		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
Glicina 50 mM	100	100	27.900	17.900	21.800
HEPES 25 mM		250	24.700	16.600	18.200
arginina 100 mM		500	26.500	14.000	17.300
Glicina 50 mM		1000	30.100	14.500	17.700
HEPES 25 mM		1500	35.300	12.000	12.500
arginina 100 mM		2000	41.700	8.200	11.700

Los resultados mostraron que tanto el cloruro de calcio como el cloruro de magnesio reducían el nivel de HCP en la combinación de pico del Mab-Select en comparación con el cloruro sódico a pH 6,0 (Tabla 5) y el pH 7,5 (Tabla 6).

EJEMPLO 5: Eliminación de las especies con menos enlaces disulfuro (UDB)

En este ejemplo, se examinó la capacidad del lavado con CaCl₂ para eliminar las especies con menos enlaces disulfuro (UDB).

Se realizaron dos ciclos de rmp Protein A Sepharose™ FF básicamente como se describe en el ejemplo 1.

Dimensiones de la columna - 1,0 cm x 11,4 cm

Caudal operativo - 150 cm/hr

Equilibrado 1 - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Lavado abundante - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (1 volumen de columna)

Lavado 1 - Acetato 50 mM, CaCl₂ 2,0 M, pH 5,0 para el ciclo 1; ninguno para el ciclo 2

Lavado 2 - Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Lavado 3 - Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)

Elución - Glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)

Regeneración 1 - citrato sódico 20 mM, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)

Regeneración 2 - guanidina HCl 6 M (2 volúmenes de columna)

Lavado de regeneración - Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Almacenamiento - Etanol al 16% (5 volúmenes de columna)

Temperatura del ciclo: 2°C-8°C

Las columnas rmp Protein A Sepharose FF Se equilibraron con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. A continuación se cargaron las columnas a una carga de aproximadamente 10 mg de producto/ml de resina. Esto fue seguido de lavado abundante de 1 volumen de columna con tampón de equilibrado y a continuación 5 volúmenes de columna de solución de Lavado 1. Esta solución de Lavado 1 consistió en acetato 50 mM, CaCl₂ 2,0 M, pH 5,0 para el ciclo 1, mientras que se omitió completamente para el ciclo 2. A continuación, el Lavado 1 fue seguido de 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5 y 7 volúmenes de columna de Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5. El anticuerpo monoclonal se eluyó desde la columna rmp Protein A Sepharose™ FF con glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,1. A continuación, se neutralizó la combinación de productos a 7,8-8,2 con Tris 2 M pH 8,5. A continuación, las columnas se regeneraron, se lavaron y se almacenaron. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: % de UDB para las muestras lavadas con y sin calcio

nº de ciclo	Muestra	% de UDB
1	Acetato 50 mM, CaCl ₂ 2,0 M, pH 5,0	9,5
2	Ninguno (Testigo)	20,8

Se observó una reducción 2 veces mayor en los niveles de UDB para el ciclo que tenía el lavado adicional con acetato 50 mM, CaCl₂ 2,0 M, pH 5,0.

EJEMPLO 6: Eliminación de HCP e IRT con lavados con otras sales de cationes divalentes

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los lavados que contenían MnCl₂ o NiCl₂ para eliminar las impurezas de una preparación que contenía el anticuerpo monoclonal anti-Aβ AAB.

Se realizaron dos ciclos para evaluar el efecto de los lavados que contenían otras sales de cationes divalentes tales como MnCl₂ y NiCl₂. Se realizaron también dos ciclos testigo - uno mediante lavado con Tris 50 mM,

NaCl 1,0 M, pH 7,5 (sin eliminación esperada de IRT o HCP) y otro mediante lavado con Tris 50 mM, CaCl₂ 2,0 M, pH 7,5.

Se purificó a pequeña escala el cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal, utilizando una columna MabSelect Protein A (9 ml) conectada a un sistema de cromatografía GE Healthcare ÄKTA FPLC. Los ciclos de MabSelect se realizaron como se describe a continuación. Como se describe a continuación, todos los parámetros operativos eran idénticos para los cuatro ciclos salvo para el Lavado 1, que fue variable (Tabla 8).

Dimensiones de la columna - 1,0 cm x 11,5 cm (9 ml)
Caudal operativo - 300 cm/h (Equilibrado, Lavado 2, Elución, Regeneración, Almacenamiento)
Caudal operativo - 230 cm/h (Carga, Lavado abundante, Lavado 1)
Equilibrado 1 - Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5,0 volúmenes de columna)
Lavado 1 - Variable (Véase la Tabla 8 para la composición)
Lavado 2 - Tris 50 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
Elución - Glicina 50 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0 (3 volúmenes de columna)
Regeneración - NaOH 50 mM, Na₂SO₄ 0,5 M (5 volúmenes de columna)
Almacenamiento - Etanol al 16%, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
Temperatura del ciclo: 18°C-24°C

Se equilibró la columna MabSelect Protein A con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. La columna se cargó a aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. La carga restante se eliminó de la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. A continuación se lavó la columna con una de las soluciones descritas en la Tabla 11. Antes de la elución, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5. El producto se eluyó desde la columna MabSelect Protein A con glicina 50 mM, NaCl 10 mM, pH 3,0. La combinación de productos se neutralizó a pH 8,0 con Tris 2 M pH 9,0. La columna se regeneró con 5 volúmenes de columna de NaOH 50 mM, Na₂SO₄ 0,5 M, a continuación se almacenó con 5 volúmenes de columna de etanol al 16%, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Los resultados se muestran en la Tabla 8 (eliminación de HCP) y en la Tabla 9 (eliminación de IRT).

Tabla 8: Eliminación de HCP con diversas soluciones de lavado

nº de ciclo	Condición del Lavado 1	HCP (PPM)
1	Tris 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5	17.600
2	acetato sódico 50 mM, MnCl ₂ 1,5 M, pH 5,0*	10.600
3	acetato sódico 50 mM, NiCl ₂ 1,5 M, pH 5,0*	4,700
4	Tris 50 mM, CaCl ₂ 2,0 M, pH 7,5	6.500

* se eligió un pH 5,0 debido a la solubilidad del MnCl₂ y del NiCl₂

Tabla 9: Eliminación de IRT con diversas soluciones de lavado

nº de ciclo	Condición del Lavado 1	IRT (%)
1	Tris 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5	2,78
2	acetato sódico 50 mM, MnCl ₂ 1,5 M, pH 5,0*	0,77
3	acetato sódico 50 mM, NiCl ₂ 1,5 M, pH 5,0*	0,47
4	Tris 50 mM, CaCl ₂ 2,0 M, pH 7,5	0,87

* se eligió un pH 5,0 debido a la solubilidad del MnCl₂ y del NiCl₂

La Tabla 8 muestra que el nivel de HCP presentes en los ciclos que fueron lavados con soluciones que contenían cationes divalentes tenía 1,5-3,5 veces menos HCP que el testigo (lavado con NaCl 1,0 M). La Tabla 9 muestra que los ciclos que contenían los lavados con soluciones de sales de cationes divalentes también proporcionaban una eliminación de IRT > 3,5 veces mayor en comparación con el ciclo con soluciones de lavado que contenían NaCl 1,0 M. Por lo tanto, estos resultados demostraron que los lavados con sales con otros cationes divalentes (por ejemplo, con MnCl₂ o NiCl₂), diferentes de CaCl₂, también eran eficaces en la eliminación de impurezas.

Equivalentes Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, mediante tan solo una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descritas en el presente documento. Tales equivalentes pretenden quedar abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Neuralab Limited, et al.

<120> METODOS DE PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI A BETA

<130> ELN-053PC

<150> 60/691,821

<151> 2005-06-17

5

<160> 47

<170> Patente en version 3.3

10

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripcion de Secuencia Artificial: Constructo Sintético

<400> 1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

5	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	1 5 10 15
10	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser	20 25 30
15	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35 40 45
20	Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro	50 55 60
25	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65 70 75 80
30	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly	85 90 95
35	Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100 105 110
40	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115 120 125
45	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130 135 140
50	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145 150 155 160
55	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165 170 175
60	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180 185 190
65	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195 200 205
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210 215
	<210> 2	
	<211> 449	

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Constructo Sintético

<400> 2

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

ES 2 402 650 T3

	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
5	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
10	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
15	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
20	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
25	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
30	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
35	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
40	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245						250					255		
45	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
50	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			275				280						285				
55	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		290					295					300					
60	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
65	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				325						330					335		
70	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				340					345					350			

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

5 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

10 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

15 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

20 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

25 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

30 Lys

<210> 3
<211> 113
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Asp o Tyr

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Ser o Thr

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> Ser o Thr

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Leu, Ile, o Val

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (50)
<223> Arg o Lys

65

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (88)
 <223> Val o Leu

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (109)
 <223> Val o Leu

 <400> 3

 15 Xaa Val Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Xaa Leu Pro Val Thr Xaa Gly
 1 5 10 15

 20 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

 25 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 30 Pro Xaa Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 35 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

 40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

 45 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
 100 105 110

 50 Arg
 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Gln, Lys, o Arg

 65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (78)
 <223> Ser o Thr

 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (87)
 <223> Arg o Lys
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (88)
 <223> Ala, Ser, o Thr
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (114)
 <223> Leu, Thr, Ile, o Val
 <400> 4
 15
 Glu Val Xaa Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 25 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 30 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60
 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr
 65 70 75 80
 40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 50 Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <400> 5
 60
 65

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

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 6

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

20 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

30 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

35 <210> 7
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

45 <400> 7

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

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

5 <210> 8
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <400> 8

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

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

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

30 Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
 50 55 60

35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

45 Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

55 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

60

65

ES 2 402 650 T3

	130		135		140											
5	Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 150	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 155	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160
10	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 165	Thr	Ser	Gly	Val	His 170	Thr	Phe	Pro	Ala	Val 175	Leu
15	Gln	Ser	Ser	Gly 180	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 185	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser
20	Ser	Ser	Leu 195	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 200	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 205	His	Lys	Pro
25	Ser	Asn 210	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 215	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Lys
30	Thr 225	His	Thr	Cys	Pro	Pro 230	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 235	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro 240
35	Ser	Val	Phe	Leu	Phe 245	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 250	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 255	Ser
40	Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val 265	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp 270
45	Pro	Glu 275	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285	Val	His	Asn
50	Ala	Lys 290	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 295	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr 300	Tyr	Arg	Val
55	Val 305	Ser	Val	Leu	Thr	Val 310	Leu	His	Gln	Asp	Trp 315	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 320
60	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 325	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 330	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 335	Lys
65	Thr	Ile	Ser	Lys 340	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 345	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 350	Tyr	Thr
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 355	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val 360	Ser	Leu	Thr
	Cys	Leu 370	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 375	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala 380	Val	Glu	Trp	Glu

5		Ser 385	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 390	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr 395	Thr	Pro	Pro	Val	Leu 400
10		Asp	Ser	Asp	Gly	Ser 405	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser 410	Lys	Leu	Thr	Val	Asp 415	Lys
15		Ser	Arg	Trp	Gln 420	Gln	Gly	Asn	Val	Phe 425	Ser	Cys	Ser	Val	Met 430	His	Glu
20		Ala	Leu	His 435	Asn	His	Tyr	Thr	Gln 440	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 445	Pro	Gly
		Lys															
25	<210>	9															
	<211>	113															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia Artificial															
30	<220>																
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
35	<222>	(3)															
	<223>	Val o Leu															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
40	<222>	(7)															
	<223>	Ser o Thr															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
45	<222>	(14)															
	<223>	Thr o Ser															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
50	<222>	(17)															
	<223>	Gln, Asp, o Asn															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
55	<222>	(30)															
	<223>	Ile o Val															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
60	<222>	(50)															
	<223>	Arg o Lys															
	<220>																
	<221>	MOD_RES															
65	<222>	(88)															
	<223>	Val o Leu															

<220>
<221> MOD_RES
<222> (105)
5 <223> Gly o Ala

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (109)
<223> Val o Leu

<400> 9

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

20 Xaa Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Xaa His Ser
20 25 30

25 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

30 Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

35 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

45 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

50 <210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<220>
<221> MOD_RES
60 <222> (1)
<223> Gln o Glu

<220>
<221> MOD_RES
65 <222> (2)
<223> Val o Ala

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (64)
 <223> Ser o Thr

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (77)
 <223> Lys o Arg

 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (78)
 <223> Ser o Thr

 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (83)
 <223> Thr o Ser

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (84)
 <223> Met, Ile, o Leu

 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (86)
 <223> Asn, Ser, o Thr

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (87)
 <223> Met, Val, o Leu

 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (118)
 <223> Leu o Ser

 <400> 10

 45

 50

 55

 60

 65

ES 2 402 650 T3

Xaa Xaa Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 5
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 15
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Xaa
 50 55 60
 20
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Xaa Gln Val
 65 70 75 80
 25
 Val Leu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 30
 Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 35
 Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 40
 <210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <400> 11
 50
 55
 60
 65

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

Arg

<210> 12
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
<400> 12

ES 2 402 650 T3

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

10 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

15 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

20 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

30 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

35 Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr
100 105 110

40 Trp Gln Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

45 <210> 13
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
<400> 13

55

60

65

ES 2 402 650 T3

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

10 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His Ser
20 25 30

15 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

20 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

35 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

40 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

45 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

50 Tyr Pro Arg Gly Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

55 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

60 Tyr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

	<210> 14
	<211> 453
	<212> PRT
5	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
10	<400> 14
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	

	Glu	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Glu	
5	1				5				10						15		
	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	
10				20					25					30			
	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	
15			35					40					45				
	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser	
20		50					55					60					
	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	
25	65					70					75					80	
	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
30					85					90					95		
	Cys	Val	Arg	Arg	Pro	Ile	Thr	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	
35				100					105					110			
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
40			115					120					125				
	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
45		130					135					140					
	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
50	145					150					155					160	
	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
55					165					170					175		
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
60				180					185					190			
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
65			195					200					205				
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
70		210					215					220					
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
75	225					230					235					240	
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	

ES 2 402 650 T3

	245	250	255
5	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val 260 265 270		
10	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 275 280 285		
15	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 290 295 300		
20	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310 315 320		
25	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala 325 330 335		
30	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340 345 350		
35	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 355 360 365		
40	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370 375 380		
45	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr 385 390 395 400		
50	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405 410 415		
55	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420 425 430		
60	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 435 440 445		
65	Leu Ser Pro Gly Lys 450		

<210> 15
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 10
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(20)
 <220>
 <221> mat_peptido
 15
 <222> (21)..(132)
 <400> 15
 20 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 -20 -15 -10 -5
 25 Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 -1 1 5 10
 30 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn
 15 20 25
 35 Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
 30 35 40
 40 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 45 50 55 60
 45 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 50 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 80 85 90
 55 Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 95 100 105
 60 Leu Glu Ile Lys
 110
 <210> 16
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 65
 <220>

<221> SEÑAL
<222> (1)..(19)

5 <220>
<221> mat_peptido
<222> (20)..(142)

<400> 16

10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
-15 -10 -5

15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
-1 1 5 10

20

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
15 20 25

25

Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
30 35 40 45

30

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
50 55 60

35

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
65 70 75

40

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
80 85 90

45

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
95 100 105

50

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 17
<211> 131
55 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SEÑAL
60 <222> (1) .. (19)

<220>
<221> mat_peptido
<222> (20)..(131)

65

<400> 17

ES 2 402 650 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5

5 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

-1 1 5 10

10 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
15 20 25

15 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

20 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

25 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

30 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
80 85 90

35 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105

35 Glu Leu Lys
110

<210> 18

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<220>

<221> mat_peptido

<222> (20)..(142)

<400> 18

ES 2 402 650 T3

5 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 -15 -10 -5
 10 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 -1 1 5 10
 15 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25
 20 Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 30 35 40 45
 25 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60
 30 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 65 70 75
 35 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 80 85 90
 40 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 95 100 105
 45 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 50 <210> 19
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)
 60 <220>
 <221> mat_peptido
 <222> (20)..(142)
 65 <400> 19

ES 2 402 650 T3

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

40 <210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <400> 20

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

5	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly 1 5 10 15
10	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser 20 25 30
15	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35 40 45
20	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro 50 55 60
25	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80
30	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser 85 90 95
35	Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110
40	<210> 21 <211> 120 <212> PRT <213> Secuencia Artificial
45	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
50	<400> 21
55	
60	
65	

ES 2 402 650 T3

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 20 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 25 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 30 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 35 <210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 <400> 22
 45
 50 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 55 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 60 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 65

ES 2 402 650 T3

	50	55	60
5	Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu		
	65	70	75 80
10	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
		85	90 95
15	Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
		100	105 110
20	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
		115	120
	<210> 23		
	<211> 120		
	<212> PRT		
25	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado		
30	<400> 23		
35	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
	1	5	10 15
40	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser		
		20	25 30
45	Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
		35	40 45
50	Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser		
		50	55 60
55	Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
	65	70	75 80
60	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
		85	90 95
65	Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
		100	105 110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
		115	120

<210> 24
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 24

10

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

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

20

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

25

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

30

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

35

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

40

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

45

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 25

55

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

60

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

65

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 5
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 15
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 25
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 35 <400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 40
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 45
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 50
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 55
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 65
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

15 <400> 27

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

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

25

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

30

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

35

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

40

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

45

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

50

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

60 <400> 28

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

65

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

20 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

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

30 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

35 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 120

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 29

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

15 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

20 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

35 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 120

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 30

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

15 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

20 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

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

35 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

45 <400> 31

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 20 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 25 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 30 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 35 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 32
 <211> 121
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 45 <400> 32
 50 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 55 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 60 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 65 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

ES 2 402 650 T3

5 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 10 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 15 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
 115 120
 <210> 33
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 25 <400> 33
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 35 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 40 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 45 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 50 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 55 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 60 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
 115 120
 <210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 34

5

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

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

15

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

20

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

30

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

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

40

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 35

50

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

55

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

60

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

65

5 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 15 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 25 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 30 <400> 36
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 45 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 50 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 55 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 60 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 65 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 37

10

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

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

20

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

25

Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

30

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

35

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

40

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

45

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 38

55

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

60

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

65

ES 2 402 650 T3

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 5
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 15
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 20
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 25
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30
 <210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 40
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 45
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 50
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 55
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 65
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 70
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

15

<400> 40

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

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
20 25 30

25

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

30

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

35

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

40

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

45

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

50

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 41

60

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

65

ES 2 402 650 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

5

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

10

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

15

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80

20

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

25

Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 42
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Val o Ile

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> Ser o Thr

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> Thr o Ser

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> Leu o Pro

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)
 <223> Ile o Val

65

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (50)
 <223> Arg, Gln, o Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (88)
 <223> Val o Leu
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (105)
 <223> Gln o Gly
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (108)
 <223> Lys o Arg
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (109)
 <223> Val o Leu
 20
 <400> 42

 Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 25
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser
 20 25 30
 30
 Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 35
 Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 40
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 45
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 50
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
 100 105 110
 55
 Arg
 <210> 43
 <211> 112
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado
 65
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (1)
 <223> Glu o Gln

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> Ser o Leu

 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (46)
 <223> Glu, Val, Asp, o Ser

 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (63)
 <223> Thr o Ser

 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (75)
 <223> Ala, Ser, Val, o Thr

 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (76)
 <223> Lys o Arg

 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (89)
 <223> Glu o Asp

 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (107)
 <223> Leu o Thr

 <400> 43
 40
 Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

 50 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val
 35 40 45

 55 Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

 65 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 44
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 44

```

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

```

Arg

<210> 45
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

<400> 45

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

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

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

20 Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

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

 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 46

<211> 219 .

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado

40 <400> 46

45

50

55

60

65

ES 2 402 650 T3

	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	1	5	10	15
5	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser	20	25	30	
10	Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45	
15	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60	
20	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	75	80
25	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser	85	90	95	
30	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	110	
35	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115	120	125	
40	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130	135	140	
45	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145	150	155	160
50	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165	170	175	
55	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180	185	190	
60	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195	200	205	
65	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215		
60	<210> 47				
	<211> 442				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
65	<220>				
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Anticuerpo Sintético Humanizado				

ES 2 402 650 T3

<400> 47

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr	20 25 30
15	Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val	35 40 45
20	Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val	50 55 60
25	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	65 70 75 80
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	100 105 110
40	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	115 120 125
45	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	130 135 140
50	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	145 150 155 160
55	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	165 170 175
60	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	180 185 190
65	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	195 200 205
	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	210 215 220
	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	225 230 235 240
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	245 250 255
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	260 265 270

ES 2 402 650 T3

5 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

10 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

15 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

20 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

25 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

30 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

35 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

40 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

45 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

50 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

55 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

REIVINDICACIONES

1. Método para purificar un anticuerpo anti-A β que tiene una región Fc desde un líquido de partida que comprende el anticuerpo y una o más impurezas, que comprende las etapas de:

adsorber el anticuerpo a un agente de unión a Fc que comprende una o más de la Proteína A y la proteína G; lavar el agente de unión a Fc con una solución tampón que contiene CaCl₂ a una concentración de 0,5 M a 3 M para eliminar una o más impurezas; y

recuperar el anticuerpo desde el agente de unión a Fc eluyendo el anticuerpo en un tampón de elución con un pH en un intervalo comprendido entre 2 y 4.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha una o más impurezas están seleccionadas del grupo que consiste en: especies de variantes de ultralectura de intrones (IRT), especies con menos enlaces disulfuro (UDB) y especies de bajo peso molecular (LMW).

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha una o más impurezas es una IRT.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en: una fusión de anticuerpos, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

5. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-A β humanizado.

6. Método según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo anti-A β humanizado está seleccionado del grupo que consiste en:

una versión humanizada del anticuerpo 3D6 producido por la línea celular PTA-5130 depositada en la ATCC; una versión humanizada del anticuerpo 10D5 producido por la línea celular PTA-5129 depositada en la ATCC;

una versión humanizada del anticuerpo 12A11 producido por la línea celular PTA-7271 depositada en la ATCC;

una versión humanizada del anticuerpo 266 producido por la línea celular PTA-6123 depositada en la ATCC;

y

una versión humanizada del anticuerpo 15C11 producido por la línea celular PTA-7270 depositada en la ATCC.

7. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo que tiene una región Fc se produce por recombinación.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo que tiene una región Fc se produce por recombinación en una célula de ovario de hámster chino (CHO).

9. Método según la reivindicación 1, en el que el agente de unión a Fc está inmovilizado sobre una fase sólida.

10. Método según la reivindicación 9, en el que la fase sólida comprende una o más de una perla, un gel, una resina, y una partícula.

11. Método según la reivindicación 1, en el que la solución tampón que contiene el CaCl₂ tiene un valor de pH en un intervalo comprendido entre 4 y 8.

12. Método según la reivindicación 1, en el que la solución tampón que contiene el CaCl₂ tiene un valor de pH en un intervalo comprendido entre 7,3 y 7,7.

13. Método según la reivindicación 1, en el que la solución tampón tiene una concentración de CaCl₂ en un intervalo comprendido entre 1,5 M y 2,0 M.

14. Método según la reivindicación 1, en el que la solución tampón comprende CaCl₂ 2 M.

15. Método según la reivindicación 1, en el que las etapas de adsorción del anticuerpo a un agente de unión a Fc y lavado del agente de unión a Fc se realizan a una temperatura en el intervalo comprendido entre 2°C y 24°C.

16. Método según la reivindicación 2, en el que la una o más impurezas comprenden adicionalmente uno o más de una proteína de la célula hospedadora, un ADN de la célula hospedadora, una proteína de cultivo celular, y mezclas de las mismas.

17. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de recuperación del anticuerpo desde el agente de unión a Fc comprende eluir la proteína utilizando un tampón de elución con un pH en un intervalo comprendido entre 2,5 y 3,5.

- 5 **18.** Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente una etapa de cromatografía seleccionada del grupo que consiste en: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).
- 10 **19.** Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente una etapa de purificación adicional seleccionada del grupo que consiste en: cromatografía con hidroxapatita, diálisis, cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa (RP-HPLC), y cromatofocalización.
- 15 **20.** Método según la reivindicación 1, en el que la una o más impurezas comprenden una o más variantes de ultralectura de intrones del anticuerpo y la solución de elución que contiene el anticuerpo tiene un nivel de variantes de ultralectura de intrones que es al menos 5 veces inferior al nivel de variantes de ultralectura de intrones en el líquido de partida.
- 20 **21.** Método según la reivindicación 20, en el que una solución que contiene el anticuerpo recuperado en la solución de elución tiene un nivel de variantes de ultralectura de intrones que es al menos 10 veces inferior al nivel de variantes de ultralectura de intrones en el líquido de partida.
- 25 **22.** Método según la reivindicación 1, en el que la una o más impurezas comprenden una o más variantes de ultralectura de intrones del anticuerpo y las variantes de ultralectura de intrones comprenden menos de un 1% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 30 **23.** Método según la reivindicación 22, en el que las variantes de ultralectura de intrones comprenden menos de un 0,8% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 24.** Método según la reivindicación 23, en el que las variantes de ultralectura de intrones comprenden menos de un 0,5% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 35 **25.** Método según la reivindicación 24, en el que las variantes de ultralectura de intrones comprenden menos de un 0,2% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 26.** Método según la reivindicación 1, en el que la una o más impurezas comprenden una o más especies de bajo peso molecular del anticuerpo y las especies de bajo peso molecular comprenden menos de un 1% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 40 **27.** Método según la reivindicación 26, en el que las especies de bajo peso molecular comprenden menos de un 0,8% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 28.** Método según la reivindicación 27, en el que las especies de bajo peso molecular comprenden menos de un 0,5% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 45 **29.** Método según la reivindicación 28, en el que las especies de bajo peso molecular comprenden menos de un 0,2% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 50 **30.** Método según la reivindicación 1, en el que la una o más impurezas comprenden uno o más variantes con menos enlaces disulfuro del anticuerpo y las variantes con menos enlaces disulfuro comprenden menos de un 15% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 31.** Método según la reivindicación 30, en el que las variantes con menos enlaces disulfuro comprenden menos de un 10% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 55 **32.** Método según la reivindicación 31, en el que las variantes con menos enlaces disulfuro comprenden menos de un 5% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 33.** Método según la reivindicación 32, en el que las variantes con menos enlaces disulfuro comprenden menos de un 2% de una especie de dicho anticuerpo en la solución de elución.
- 60 **34.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de unión a A β es un anticuerpo 3D6 humanizado que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 1-448 de la SEQ ID NO:2.
- 65 **35.** Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es del isotipo IgM, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

36. Método según la reivindicación 35, en el que el anticuerpo es del isotipo IgG1 humano.

FIG. 1

Cadena ligera

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ
 51 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYCWQGTTHFP
 101 RTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL INNFYPREAK
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

→ **Cadena pesada**

Cadena pesada

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 IRSGGGRTYY SDNVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVRYD
 101 HYGSSDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTVV PSSSLGTQTY
 201 ICNVNHHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK

← **Cadena ligera** → **Cadena pesada**

251 DTLMISRTPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 301 TYRVS VLT V LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPEVL
 401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG(K)