

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 616**

51 Int. Cl.:

**C07K 17/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2003 E 10187798 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2332996**

54 Título: **Purificación de anticuerpos anti-HER2**

30 Prioridad:

**11.09.2002 US 410334 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA Way  
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**EMERY, JEFFERSON C.;  
MCDONALD, PAUL J. y  
O'LEARY, RHONA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 527 616 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Purificación de anticuerpos anti-HER2

**5 Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere generalmente a purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a un método para purificar un polipéptido (un anticuerpo) a partir de una composición que comprende al polipéptido y al menos un contaminante usando el método de cromatografía de intercambio iónico.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 La purificación a gran escala económica de proteínas es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. En general, las proteínas se producen mediante cultivos celulares, usando líneas celulares eucariotas o procariontes modificadas por ingeniería genética para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Ya que las células normalmente usadas son organismos vivos, tienen que alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos, y factores de crecimiento, generalmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada a partir de la mezcla de compuestos alimentados a las células y de los subproductos de las células en sí, hasta una pureza suficiente para su uso como agente terapéutico para seres humanos supone un desafío formidable.

25 Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de restos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Puede hacerse que algunas proteínas se secreten directamente de la célula al medio de crecimiento circundante; otras se producen intracelularmente. Para las últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación incluye la lisis de la célula, que puede efectuarse mediante varios métodos, incluyendo cizalla mecánica, choque osmótico, o tratamientos enzimáticos. Dicha disrupción libera el contenido entero de la célula al  
30 homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos se eliminan generalmente mediante centrifugación diferencial o mediante filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas intracelulares de las células huésped durante el trascurso del ciclo de producción de proteína.

35 Una vez se ha obtenido una solución aclarada que contiene la proteína de interés, su separación de las demás proteínas producidas por la célula se intenta frecuentemente usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño. Hay disponibles varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, permitiendo una adaptación precisa del esquema de purificación para la proteína concreta involucrada. La esencia de cada uno de  
40 estos métodos de separación es que puede hacerse que las proteínas se muevan a diferentes velocidades a través de una columna, logrando una separación física que aumenta a medida que pasan más hacia abajo en la columna, o puede hacerse que se adhieran selectivamente al medio de separación, eluyéndose de manera diferencial por diferentes solventes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna, y la proteína de interés no, es decir, la proteína de interés está presente en el  
45 "flujo a través".

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica cromatográfica que se usa de manera común para la purificación de proteínas. En la cromatografía de intercambio iónico, las partes cargadas en la superficie del soluto son atraídas por cargas opuestas unidas a la matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución se logra generalmente aumentando la fuerza iónica (es decir, conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y por tanto alterar la carga del soluto es otro modo de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución de gradiente) o paso a paso (elución por etapas). En el pasado, estos cambios han sido progresivos; *es decir*, el pH o conductividad se aumenta o disminuye en una sola dirección.

55 Las Patentes de los Estados Unidos N° 6.339.142 y 6.417.355 (Basey et al.) describen cromatografía de intercambio iónico para purificar polipéptidos.

60 Las Patentes de los Estados Unidos N° 6.127.526 y 6.333.398 (Blank, G.) describen la purificación de proteínas, tales como anticuerpos anti-HER2, mediante cromatografía de proteína A.

**Sumario de la invención**

65 La presente invención es como se describe en las reivindicaciones.

## Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de humMAB4D5-8 (SEC ID N°: 1) y la cadena pesada de humMAB4D5-8 (SEC ID N°: 2), respectivamente.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra un proceso de cromatografía con una etapa de lavado de gradiente lineal.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra un proceso de cromatografía con una etapa de lavado de gradiente multi-pendiente.

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

### Definiciones

La "composición" a purificar en el presente documento comprende al polipéptido de interés y uno o más contaminantes. La composición puede estar "prácticamente purificada" (es decir, que se ha sometido a una o más etapas de purificación, tales como cromatografía de proteína A) o puede obtenerse directamente a partir de una célula hospedadora u organismo que produce el polipéptido (por ejemplo, la composición puede comprender fluido de cultivo celular recogido).

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido es una proteína de mamífero, cuyos ejemplos incluyen: renina, una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina, hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes, tales como proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno de orina o de tipo tisular humano (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (por sus siglas en inglés, *regulated on activation normally T-cell expressed and secreted*, regulada en la activación, normalmente expresada en y secretada por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE, un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5, o 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NFG-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor de crecimiento insulínico (IGFBP); proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta, y gamma; factor estimulador de colonias (CSF), *por ejemplo*, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), *por ejemplo*, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficiales; factor acelerador de la descomposición; antígenos virales, tales como, *por ejemplo*, una porción de la envuelta del VIH; proteínas transportadoras; receptores autoguiados; adresinas; proteínas reguladoras, integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD 18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumores, tal como receptor de HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos anteriormente listados. Lo más preferido es un anticuerpo de longitud completa que se una a HER2 humano.

Un "contaminante" es un material que es diferente del producto polipeptídico deseado. El contaminante puede ser, sin limitación, una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado (*por ejemplo*, una variante desaminada o una variante amino-aspartato), otro polipéptido, ácido nucleico, endotoxina, etc.

Una "variante" o "secuencia variante de aminoácidos" de un polipéptido de partida es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido de partida. En general, una variante poseerá al menos un 80 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia, y lo más preferentemente al menos un 98 % de identidad de secuencia con el polipéptido nativo. El porcentaje de identidad de secuencia se determina, *por ejemplo*, mediante la versión de Fitch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1382-1386 (1983) del algoritmo descrito por Needleman et al., J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970), después de alinear las secuencias para proporcionar máxima homología. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN que codifica el polipéptido, o mediante síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, *por ejemplo*, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar el procesamiento postraduccional del polipéptido, tal como mediante el cambio del número o posición de los sitios de

glucosilación. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo restos serilo, treonilo o tirosilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)). Se describen métodos para generar variantes de secuencia de aminoácidos en la Patente de los Estados Unidos N° 5.534.615, por ejemplo.

Una "variante ácida" es una variante de un polipéptido de interés que es más ácida (por ejemplo, determinado mediante cromatografía de intercambio catiónico) que el polipéptido de interés. Las variantes ácidas pueden producirse mediante la acción de células hospedadoras recombinantes sobre el polipéptido expresado. Un ejemplo de variante ácida es una variante desaminada. Los restos glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desaminan postraduccionalmente a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo.

Una variante "desaminada" de una molécula de polipéptido es un polipéptido en el que uno o más restos de asparagina del polipéptido original se han convertido a aspartato, es decir, la cadena lateral neutra de amida se ha convertido a un resto con un carácter ácido general. Por ejemplo, "DNasa humana desaminada", tal como se usa en el presente documento, significa DNasa humana que está desaminada en el resto de asparagina en la posición 74 de la secuencia de aminoácidos de DNasa humana madura nativa (Patente de los Estados Unidos 5.279.823). El anticuerpo huMAb4D5 desaminado de los Ejemplos más adelante tiene Asn30 en CDR1 de una o ambas regiones V<sub>L</sub> del mismo convertidas a aspartato.

Un "polipéptido recombinante" es uno que se ha producido en una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado con ácido nucleico que codifica el polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de recombinación homóloga. "Transformación" y "transfección" se usan de manera intercambiable para referirse al proceso de introducir ácido nucleico en una célula. A continuación de la transformación o transfección, el ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora, o puede existir como un elemento extracromosómico. La "célula hospedadora" incluye una célula en cultivo *in vitro* así como una célula en un animal hospedador. Se describen métodos para producción recombinante de polipéptidos en la Patente de los Estados Unidos N° 5.534.615, por ejemplo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada.

El anticuerpo en el presente documento se dirige contra el "antígeno" HER2. Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, conjugados opcionalmente a otras moléculas, pueden usarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Como alternativa, pueden usarse células que expresan la molécula transmembrana como inmunógeno. Dichas células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son elevadamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, "Monoclonal" Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) donde se describe el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de

inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); y Duchosal et al. Nature 355:258 (1992).

5 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

15 La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de "una región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Polypeptides of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada;; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los restos "marco conservados" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable, tal como se definen en el presente documento. Los restos de CDR y FR del anticuerpo rhuMAB HER2 del ejemplo más adelante (humAb4D5-8) se identifican en Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992).

25 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. Principalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana.

40 La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que sea más próxima a la del roedor se acepta como el marco conservado (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)).

50 Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

55 Es importante, además, que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *es decir*, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de CDR están directa y muy sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')<sub>2</sub> se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el montaje de la molécula de F(ab')<sub>2</sub>. De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia.

En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Los fragmentos "Fv monocatenarios" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permiten al sFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los sFv véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994)).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y en Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" cuando se usa a lo largo de esta solicitud, se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al., Polypeptide Eng. 8(10):1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub> 1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub> 1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos distintos, donde los epítopos son generalmente de dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente se unirán solo a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos trispecíficos están abarcados por esta expresión cuando se usa en el presente documento. Los ejemplos de BsAbs incluyen aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula activadora citotóxica, tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185<sup>HER2</sup>/FcγRIII (CD 16), anti-CD3/anti-linfocito B maligno (1D10), anti-CD3/anti-p185<sup>HER2</sup>, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de hormona estimuladora de melanocitos, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión celular neural (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a pan carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina, tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de ricina, anti-interferón-α(IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcaloide de la vinca; BsAbs para convertir profármacos activados por enzimas, tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión de profármaco de fosfato de mitomicina a alcohol de mitomicina); BsAbs que pueden usarse como agentes fibronilíticos tal como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunológicos a receptores de la superficie celular, tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor de Fc (por ejemplo, FcγRI, o FcγRIII); BsAbs para su uso en terapia de enfermedades infecciosas, tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simplex (HSV), anti-complejo de receptor de linfocito T:CD3 /anti-gripe, anti-FcγR/anti-VIH; BsAbs para detección *in vitro* o *in vivo* de tumores, tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185<sup>HER2</sup>/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes para vacunas; y BsAbs como herramientas diagnósticas, tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (FIRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos trispecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')<sub>2</sub>).

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., Nature, 305:537-539

(1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se efectúa normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es laboriosa, y el rendimiento de producto es bajo. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan para secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

Los anticuerpos biespecíficos pueden componerse de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la cadena (o cadenas) lateral reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373, y documento EP03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la materia los agentes reticulantes adecuados, y se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con un número de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')<sub>2</sub> totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina

de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlace que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se emparejen con los dominios complementarios  $V_L$  y  $V_H$  de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

La expresión "material de intercambio iónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente (es decir, resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, resina de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse uniendo uno o más ligandos cargados a la fase sólida, por ejemplo, mediante enlace covalente. Como alternativa, o además, la carga puede ser una propiedad inherente a la fase sólida (por ejemplo, en el caso de gel de sílice, que tiene una carga general negativa).

Por "fase sólida" se pretende indicar una matriz no acuosa a la que uno o más ligandos cargados pueden adherirse. La fase sólida puede ser una columna de purificación, una fase discontinua o partículas discretas, una membrana, o filtro, etc. Los ejemplos de materiales para formar la fase sólida incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa) y otras matrices mecánicamente estables, tales como sílice (por ejemplo, vidrio de poro controlado), poli(estirendivinil)benceno, poliacrilamida, partículas de cerámica y derivados de cualquiera de las anteriores.

Una "resina de intercambio catiónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para intercambiar con cationes en una solución acuosa pasada sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede, *por ejemplo*, ser un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico comercialmente disponibles incluyen carboximetilcelulosa, BAKERBOND ABX™, sulfopropilo (SP) inmovilizado sobre agarosa (por ejemplo SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de Pharmacia) sulfonilo inmovilizado sobre agarosa (por ejemplo S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de Pharmacia).

El término "resina de intercambio aniónico" se usa en el presente documento para referirse a una fase sólida que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a ésta. Las resinas de intercambio aniónico comercialmente disponibles incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (Pharmacia).

Un "tampón" es una solución que resiste a cambios en el pH mediante la acción de sus componentes ácido-base conjugados. Varios tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón se describe en Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., Ed. Calbiochem Corporation (1975). En una realización, el tampón tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 (por ejemplo, como en el Ejemplo 1 más adelante). Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen tampones MES, MOPS, MOPSO, fosfato, acetato, citrato, succinato, y amonio, así como combinaciones de estos. Los tampones usados en los métodos divulgados también comprenden normalmente una sal, tal como NaCl, KCl o NaHOAc.

El "tampón de equilibrado" es el tampón que se usa para equilibrar la resina de intercambio iónico. El tampón de equilibrado también puede usarse para cargar la composición que comprende la molécula de polipéptido de interés y uno o más contaminantes en la resina de intercambio iónico. El tampón de equilibrado tiene una conductividad y/o pH tal que la molécula de polipéptido de interés se une a la resina de intercambio iónico.

La expresión "tampón de lavado" se usa en el presente documento para referirse al tampón que se hace pasar sobre la resina de intercambio iónico después de cargar y antes de la elución de la proteína de interés. El tampón de lavado puede servir para eluir uno o más contaminantes de la resina de intercambio iónico. La conductividad y/o pH del tampón de lavado es/son tales que los contaminantes se eluyen de la resina de intercambio iónico, pero no cantidades significativas del polipéptido de interés. El "tampón de lavado" comprende preferentemente una mezcla de tampón de equilibrado y tampón de elución, y puede por lo tanto describirse por el porcentaje de tampón de elución que comprende en un volumen dado.

El "tampón de elución" se usa para eluir el polipéptido de interés de la fase sólida. La conductividad y/o pH del tampón de elución es/son tales que el polipéptido de interés se eluye de la resina de intercambio iónico.

Puede usarse un "tampón de regeneración" para regenerar la resina de intercambio iónico de tal forma que pueda reutilizarse. El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH según sea necesario para eliminar sustancialmente todos los contaminantes y el péptido de interés de la resina de intercambio iónico.

5 El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante el transporte de iones. Por lo tanto, con una cantidad en aumento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medida de la conductividad es mmhos (mS/cm), y puede medirse usando un medidor de conductividad, tal como aquellos vendidos, *por ejemplo*, por Orion. La conductividad de una solución puede alterarse cambiando la concentración de iones en esta. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponador y/o la concentración de una sal (por ejemplo, Na/HOAc; NaCl o KCl) en la solución puede alterarse para lograr la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal de los varios tampones se modifica para lograr la conductividad deseada.

15 Por "purificar" un polipéptido de una composición que comprende al polipéptido y uno o más contaminantes se entiende aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición eliminando (completa o parcialmente) al menos un contaminante de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso de purificación general que da como resultado una composición "homogénea". "Homogéneo" se usa en el presente documento para referirse a una composición que comprende al menos un 70 % en peso del polipéptido de interés, basándose en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % en peso, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % en peso, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso.

A menos que se indique lo contrario, el término "HER2" cuando se usa en el presente documento se refiere a proteína HER2 de humano y "HER2" se refiere al gen *HER2* humano. El gen *HER2* humano y la proteína HER2 se describen en Semba et al., PNAS (EE.UU.) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (número de acceso de Genbank X03363), por ejemplo.

30 El término "huMAb4D5-8" cuando se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo anti-HER2 humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEC ID N<sup>o</sup>: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 o variantes de secuencias de aminoácidos de los mismos que mantiene la capacidad de unirse a HER2 y de inhibir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan HER2 (véase la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.677.171).

35 El "pi" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refiere al pH al cual las cargas positivas del polipéptido equilibran su carga negativa; puede calcularse el pi a partir de la carga neta de los restos de aminoácidos del polipéptido o puede determinarse mediante enfoque isoeléctrico.

40 "Unir" una molécula a un material de intercambio iónico se refiere a exponer la molécula al material de intercambio iónico en condiciones adecuadas (pH/conductividad) de tal forma que la molécula se inmoviliza de manera reversible en o sobre el material de intercambio iónico por medio de interacciones iónicas entre la molécula y un grupo cargado o grupos cargados del material de intercambio iónico.

"Lavar" el material de intercambio iónico se refiere a hacer pasar un tampón adecuado a través o sobre el material de intercambio iónico.

45 "Eluir" una molécula (por ejemplo, péptido o contaminante) de un material de intercambio iónico significa eliminar la molécula de este alterando la fuerza iónica del tampón circundante al material de intercambio iónico de tal forma que el tampón compite con la molécula por los sitios cargados en el material de intercambio iónico.

50 "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a profiláctico o medidas preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen a aquellos que ya tienen el trastorno y a aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

55 Un "trastorno" es cualquier afección que pueda beneficiarse de tratamiento con el polipéptido purificado, tal como se describe en el presente documento. Esto incluye trastornos y enfermedades tanto agudas como crónicas y aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

60 El término "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugada directamente o indirectamente al polipéptido. El marcador puede ser detectable en sí (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química del compuesto o composición de sustrato que es detectable.

65 La expresión "agente citotóxico" cuando se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos, por ejemplo, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinosido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel, toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalano, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.675.187), melfalano y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como tamoxifeno y onapristona.

## 10 Modos para llevar a cabo la invención

La invención del presente documento proporciona métodos para purificar un polipéptido a partir de una composición (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende al polipéptido y uno o más contaminantes. La composición es generalmente una resultante de la producción recombinante del polipéptido, pero puede ser la resultante de la producción del polipéptido por síntesis peptídica (u otros medios sintéticos) o puede purificarse el polipéptido a partir de una fuente nativa del polipéptido, El polipéptido es un anticuerpo que se une al antígeno HER2.

Para la producción recombinante del polipéptido, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica al polipéptido se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, en los casos en el que el polipéptido es un anticuerpo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción (por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.534.615).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son células procariotas, levaduras, o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos y Gram-positivos, por ejemplo, enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados para clonación u hospedadores de expresión para vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, es la más usada entre los microorganismos hospedadores de eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están disponibles de manera común y son útiles en el presente documento, tales como hospedadores de *Schizosaccharomyces pombe*/*Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. fragilis* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilaram* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*/*Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*, y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, hospedadores de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptido glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células de planta e insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles varias cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como los virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden usarse como hospedadores.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen, pero sin limitación, células de riñón de mono CV1 transformadas mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL

3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y células de hepatoma humano (Hep G2).

- 5 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de polipéptidos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

- 10 Las células hospedadoras usadas para producir el polipéptido de esta invención pueden cultivarse en varios medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patentes de los Estados Unidos N° 4.767.704, 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o Solicitud de Patente de los Estados Unidos, 30.985
- 15 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco de GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede también introducirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas para los expertos en la materia. Las
- 20 condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

- 25 Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido puede producirse intracelularmente, y en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o células lisadas (por ejemplo, como resultado de la homogeneización), se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. En los casos en los que el polipéptido se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran
- 30 primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

- A continuación se somete al polipéptido a una o más etapas de purificación, incluyendo el método de cromatografía de intercambio iónico como se describe en el presente documento. Los ejemplos de procedimientos adicionales de purificación que pueden efectuarse antes de, durante, o después del método de cromatografía de intercambio iónico incluyen fraccionación en una cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, sobre fenil sefarosa), precipitación por etanol, enfoque isoelectrico, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre HEPARIN SEPHAROSE™, posterior cromatografía de intercambio aniónico y/o posterior cromatografía de intercambio catiónico, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación por sulfato de amonio, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A, proteína G, un anticuerpo, un sustrato, ligando o antígeno específico como reactivo de captura).
- 40

- La cromatografía de intercambio iónico se efectúa como se describe en el presente documento. Se emplea una resina de intercambio catiónico. En general, puede usarse una resina de intercambio catiónico para polipéptidos con  $pI$  mayores de aproximadamente 7 y puede usarse resina de intercambio aniónico para polipéptidos con  $pI$  menores de aproximadamente 7.
- 45

- La resina de intercambio catiónico se prepara de acuerdo con métodos conocidos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Generalmente, se pasa a través de la resina de intercambio iónico un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que comprende al polipéptido de interés y uno o más contaminantes sobre la resina. De manera conveniente, el tampón de equilibrado es el mismo que el tampón de carga, pero esto no es necesario.
- 50

- Después del equilibrado, se carga una solución acuosa que comprende al polipéptido de interés y contaminante (o contaminantes) sobre la resina de intercambio catiónico usando un tampón que está a un pH y/o conductividad tal que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio catiónico. Como ya se ha discutido anteriormente, el tampón de equilibrado puede usarse para cargar. En una realización preferida, el tampón de equilibrado está a una primera baja conductividad (por ejemplo, de aproximadamente 4 a aproximadamente 4 mmhos) durante la carga. Un pH ilustrativo para el tampón de equilibrado es aproximadamente 5,5.
- 55

- La cantidad del polipéptido de interés cargada sobre la resina puede depender de varios factores, incluyendo, por ejemplo, la capacidad de la resina, el rendimiento deseado, y la pureza deseada. Preferentemente, se carga en la resina de intercambio iónico de aproximadamente 1 mg de proteína/ml de resina a aproximadamente 100 mg de proteína/ml de resina, más preferentemente, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml y aún más preferentemente de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml del polipéptido (por ejemplo, de un anticuerpo de longitud completa).
- 60
- 65

Después de cargar, se lava la resina de intercambio catiónico. Durante el proceso de lavado, se pasa tampón de lavado sobre la resina. La composición del tampón de lavado se selecciona normalmente para eluir tantos contaminantes como sea posible de la resina sin eluir una cantidad sustancial del polipéptido de interés. Esto puede lograrse usando un tampón de lavado con una conductividad o pH aumentados, o ambos, en comparación con el tampón de equilibrado.

En una realización, el tampón de lavado comprende tampón de equilibrado en el que la concentración de sal se ha aumentado. La concentración de sal puede aumentarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En la realización preferida, el tampón de lavado es una mezcla de tampón de equilibrado y tampón de elución. En este caso, la concentración de sal deseada en el tampón de lavado se logra aumentando el porcentaje del tampón mayor en sal en el tampón de lavado. El tampón de elución tiene normalmente una concentración de sal y conductividad mayor que el tampón de equilibrado. Por ejemplo, en la realización preferida, el tampón de elución tiene preferentemente una conductividad de entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm, más preferentemente entre aproximadamente 8,5 mS/cm y 9,5 mS/cm, mientras que el tampón de equilibrado tiene una conductividad de entre aproximadamente 4 y 6 mS/cm, más preferentemente entre aproximadamente 4,5 y 5,5 mS/cm. Por tanto, a medida que el porcentaje de tampón de elución aumenta, la concentración de sal y la conductividad del tampón de lavado aumentan.

El aumento de la concentración de sal del tampón de equilibrado al tampón de lavado inicial puede ser paso a paso o gradual según se desee. La cantidad del aumento inicial dependerá de la conductividad deseada del tampón de lavado al comienzo del proceso de lavado.

Preferentemente, el aumento inicial en la concentración de sal se logra mediante un aumento paso a paso en el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado. Un experto en la materia será capaz de determinar la cantidad del aumento de tampón de elución basándose en la concentración de sal del tampón de equilibrado, la concentración de sal del tampón de elución y de la conductividad deseada. El aumento es preferentemente de aproximadamente 0 % de tampón de elución a un porcentaje inicial de entre aproximadamente 10 % y 50 % de tampón de elución, más preferentemente de entre aproximadamente 20 % y 30 % de tampón de elución y aún más preferentemente de aproximadamente 25 % de tampón de elución. En la realización preferida, el aumento inicial es a un porcentaje inicial de aproximadamente el 26 % de tampón de elución.

En una realización, se usa un lavado de gradiente de concentración lineal de sal. En este proceso de lavado, la concentración de sal del tampón de lavado cambia a una velocidad constante, generalmente aumentando desde una primera concentración inicial a una segunda mayor concentración, a medida que progresa el lavado. Preferentemente, se crea un gradiente de concentración lineal de sal aumentando el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado a una velocidad constante. La velocidad de aumento en la concentración de sal del tampón de lavado puede describirse mediante la pendiente de la recta formada representando el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado frente a volúmenes de columna de tampón de lavado que se han pasado sobre la columna.

En la Figura 2 se representa un lavado de gradiente lineal ilustrativo. En este caso, una sola pendiente define el gradiente de concentración de sal y por lo tanto, la velocidad de cambio en la concentración de sal durante el lavado. La velocidad del cambio, y por lo tanto, la pendiente, se selecciona para lograr el rendimiento máximo del polipéptido de interés con la mayor pureza. Un experto en la materia será capaz de determinar la pendiente óptima para un polipéptido y masa de carga particulares. En general, las cargas con una mayor concentración de proteína necesitarán una pendiente más pronunciada, mientras que las cargas menores necesitarán pendientes menos pronunciadas para lograr el rendimiento y pureza deseados para una proteína dada.

En otra realización, se usa un lavado de gradiente multi-pendiente. En este proceso de lavado, se llevan a cabo un número de gradientes lineales de sal con diferentes pendientes de manera consecutiva. Por tanto, la concentración de sal en el tampón de lavado que pasa sobre la columna aumenta a una primera velocidad para una primera porción del lavado, o segmento, y a otras una o más velocidades adicionales para otras porciones definidas, o segmentos del lavado. Se ilustra un gradiente de sal de tres segmentos en la Figura 4 y se describe en más detalle a continuación.

Cada segmento de gradiente lineal de sal supone una fracción del volumen total de lavado que pasa sobre la resina. La proporción del volumen total de lavado que supone cada segmento de gradiente particular variará dependiendo del número y duración de los segmentos.

Un experto en la técnica reconocerá que el número de segmentos no está limitado en modo alguno y se seleccionarán basándose en las circunstancias particulares. Los factores que afectarán al número preferido de segmentos incluyen, por ejemplo, la naturaleza de la proteína que se esté eluyendo, el volumen total de lavado y el intervalo de carga anticipado. Por ejemplo, un lavado de gradiente multipendiente permite que un solo protocolo de lavado sea efectivo a lo largo de un intervalo amplio de carga de columna. Por tanto, si se van a purificar varias masas diferentes de carga usando el mismo protocolo de lavado, los segmentos múltiples darán como resultado un rendimiento y pureza más consistentes a lo largo del intervalo de carga.

Cada segmento de un lavado multisegmento termina preferentemente cuando se cumple una condición

predeterminada. Por ejemplo, cuando la concentración de proteína en el flujo a través alcanza un nivel predeterminado, o cuando el tampón de lavado ha alcanzado una conductividad deseada. En la realización preferida, cada segmento termina cuando el tampón de lavado comprende un porcentaje predeterminado de tampón de elución, y por lo tanto, tiene una conductividad deseada.

5 Además, si el lavado comprende más de un segmento, la pendiente es preferentemente mayor en el primer segmento que en cualquier segmento adicional. Como resultado, el aumento en la conductividad del tampón de lavado será mayor en el primer segmento que en los segmentos posteriores. Si la concentración de sal se varía aumentando el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado, el aumento en el porcentaje de tampón de elución por volumen de columna será mayor en el primer segmento que en segmentos posteriores.

10 El lavado de gradiente termina preferentemente cuando se detecta una cantidad predeterminada de proteína en el flujo a través. En la realización preferida, el lavado de gradiente termina cuando la concentración en el flujo a través alcanza un nivel que corresponde a una medida de densidad óptica de 0,6 a 280 nm.

15 El proceso de lavado se completa haciendo pasar una cantidad fija de tampón de lavado sobre la columna. Esto se cita como el "volumen de retardo de lavado final". Después del último segmento de gradiente línea, se hace pasar un volumen fijo del tampón de lavado con la máxima conductividad del gradiente de lavado sobre la columna. El uso de un volumen de retardo de lavado final mayor aumenta la pureza de la proteína eluida pero puede dar lugar a un rendimiento en cierto modo reducido. Por el contrario, disminuir el volumen fijo da lugar a un rendimiento aumentado, pero puede producir una ligera disminución en la pureza de la proteína recuperada. Por tanto, el volumen fijo puede seleccionarse por el experto en la técnica para lograr el rendimiento y pureza deseados. El volumen de retardo de lavado final es de 0,4 a 1 volumen de columna del tampón de lavado final.

20 En una realización preferida, se usa un lavado de gradiente multipendiente con tres segmentos. Esta realización se ilustra en la Figura 3. El primer segmento preferentemente supone aproximadamente un tercio del volumen total de lavado, durante el cual el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado aumenta desde un porcentaje inicial de aproximadamente el 26 % a aproximadamente el 50 %, más preferentemente a aproximadamente un 54 %, dando como resultado un aumento correspondiente en la concentración de sal y conductividad. Se hacen pasar aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón de lavado sobre la columna durante este primer segmento de gradiente lineal. Esto representa un cambio de entre aproximadamente un 5 % y un 6 % de tampón de elución por volumen de columna, como puede verse en la pendiente del primer segmento en la Figura 3.

25 Se comienza un segundo segmento de gradiente lineal modificando la velocidad de cambio del porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado. En la realización preferida, la velocidad de cambio del porcentaje de tampón de elución se reduce a aproximadamente un 3,5 % por volumen de columna. El segundo segmento preferentemente continúa durante aproximadamente un sexto del volumen total de lavado. Por tanto, se hacen pasar aproximadamente 2 volúmenes de columna sobre la columna durante el segundo segmento. Preferentemente, el segundo segmento termina cuando el porcentaje de tampón de elución ha aumentado hasta aproximadamente un 60 %, más preferentemente a aproximadamente un 61 %.

30 En el tercer segmento, la velocidad de aumento de tampón de elución se reduce adicionalmente, preferentemente en aproximadamente un 2 % por volumen de columna, más preferentemente en aproximadamente un 2,13 % por volumen de columna. El tercer segmento es el más largo de los tres y supone aproximadamente la mitad del volumen total de lavado, con aproximadamente 6 volúmenes de columna pasando sobre la columna. El tercer segmento termina cuando se mide una DO de 0,6 en el flujo a través. Durante el lavado de gradiente completo, el porcentaje de tampón de elución habrá aumentado a aproximadamente un 75 %, más preferentemente a aproximadamente un 74 % cuando se alcanza una DO de 0,6.

35 Después del proceso de lavado, se hace pasar opcionalmente una cantidad predeterminada de tampón de equilibrado. Preferentemente, se hace pasar 1 volumen de columna de tampón de equilibrado sobre la columna.

40 La molécula de polipéptido deseado se eluye a continuación de la resina de intercambio iónico. Esto se logra usando un tampón de elución que tiene un pH y/o conductividad tal que el polipéptido ya no se une a la resina de intercambio iónico y por lo tanto se eluye de esta. En la realización preferida, la conductividad del tampón de elución sobrepasa a la del tampón de equilibrado. Como alternativa, o además, el pH del tampón de elución puede aumentarse en relación al tampón de equilibrado (por ejemplo, el pH del tampón de elución puede ser de aproximadamente 6,0). El cambio en la conductividad y/o pH desde el tampón de lavado al tampón de elución puede ser paso a paso o gradual, según se desee. Como ya se ha discutido anteriormente, el tampón de elución tiene preferentemente una conductividad de entre aproximadamente 8 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm, más preferentemente entre aproximadamente 8,5 mS/cm y 9,5 mS/cm. De este modo, se recupera el polipéptido deseado de la resina de intercambio catiónico en esta etapa del método.

45 Los cambios en la conductividad son generalmente como se describe anteriormente respecto a tanto una resina de intercambio catiónico y una resina de intercambio aniónico. Un experto en la materia será capaz de optimizar los métodos para cualquier tipo de resina.

En la realización preferida de la invención, se cambia un solo parámetro (es decir, o conductividad o pH) para lograr la elución tanto del polipéptido como del contaminante, mientras que el otro parámetro (es decir, pH o conductividad, respectivamente) permanece prácticamente constante. Por ejemplo, mientras que puede diferir la conductividad de los distintos tampones, los pH de los mismos pueden ser esencialmente el mismo.

En una realización opcional de la invención, la resina de intercambio iónico se regenera con un tampón de regeneración después de la elución del polipéptido, de tal forma que la columna puede reutilizarse. En general, la conductividad y/o pH del tampón de regeneración es/son tales que sustancialmente todos los contaminantes y el polipéptido de interés se eluyen de la resina de intercambio iónico. En general, el tampón de regeneración tiene una conductividad muy alta para eluir contaminantes y polipéptido de la resina de intercambio iónico.

El método del presente documento es particularmente útil para resolver una molécula de polipéptido de interés de al menos un contaminante, donde el contaminante y la molécula de polipéptido de interés difieren solo ligeramente en carga iónica.

La preparación de polipéptido obtenida de acuerdo con el método de cromatografía de intercambio iónico del presente documento puede someterse a etapas adicionales de purificación, si fuera necesario. Las etapas de purificación ilustrativas adicionales se han discutido anteriormente.

Opcionalmente, el polipéptido se conjuga a una o más moléculas heterólogas según se desee. La molécula heteróloga puede ser, por ejemplo, una que aumente la semivida en suero del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, PEG), o puede ser un marcador (por ejemplo, una enzima, marcador fluorescente y/o radionúclido) o una molécula citotóxica (por ejemplo, una toxina, fármaco quimioterapéutico, o isótopo radiactivo, etc.).

### Ejemplos

La IgG rhuMAb HER2 humana de longitud completa (humAb4D5-8 en Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:4285-4289 (1992) que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID N° 2) se produjo de manera recombinante en células CHO. Después de la producción y secreción de la proteína al medio de cultivo celular, las células CHO se separaron del medio de cultivo celular mediante filtración de flujo tangencial (PROSTACK™). Se efectuó entonces una cromatografía de proteína A aplicando el fluido de cultivo celular recogido (FCCR) de las células CHO directamente a una columna PROSEP A™ equilibrada (Biprocessing, Ltd).

Después de la cromatografía de proteína A, se efectuó cromatografía de intercambio catiónico usando una columna de sulfopropilo (SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ (SPXLFF) (Pharmacia) para separar adicionalmente la molécula de anticuerpo anti-HER2 deseada. Se empaquetó una columna SPXLFF™. Las dimensiones fueron: 100 cm de diámetro y 35 cm de altura del lecho. La conductividad del conjunto se redujo mediante la adición de un volumen igual de agua estéril para inyección (AEPI).

Los ciclos de cromatografía para estos estudios se llevaron a cabo con un sistema UNICORN™ FPLC de Pharmacia. Se efectuaron un número de ciclos de cromatografía usando densidades de carga de 15, 30, y 45 mg de rhuMAb HER2 por ml de resina de SPXLFF. Además, se varió el volumen de retardo después del lavado de gradiente. Se ensayaron volúmenes de retardo de 1,0, 0,8, 0,6 y 0,4 columnas después del gradiente.

La concentración de proteína de cada fracción de cromatografía se determinó mediante escaneos espectrofotométricos de cada muestra. Los resultados se usaron para calcular los rendimientos de recuperación de producto. El coeficiente de extinción para rhuMAb HER2 es 1,45. Los cálculos usados para derivar los resultados son:

$$\text{Concentrac i3n de prote3na} = \frac{280 \text{ nm}}{1,45} \times \text{factor de diluci3n}$$

$$\text{Masa de prote3na} = \text{Concentrac i3n de prote3na (mg/ml)} \times \text{Volumen de fracci3n (ml)}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa de fracci3n (mg)}}{\text{Masa total}} \times 100$$

Se produjeron variantes desamidadas y otras variantes ácidas de rhuMAb HER2 cuando se produjo el anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante. Las fracciones de cada cromatografía del estudio se ensayaron para la cantidad relativa de anticuerpo variante mediante cromatografía HPIEC Dionex. Las variantes desamidadas y otras variantes ácidas formaron de aproximadamente un 15 a aproximadamente un 20 % de la composición obtenida a partir de la cromatografía de proteína A inicial. Se descubrió que los métodos de intercambio iónico descritos a continuación

pueden usarse para reducir sustancialmente la cantidad de variantes desamidadas y otras variantes ácidas en la composición anti-HER2, normalmente en aproximadamente un 50 % o más.

### Ejemplo 1

5 Se preparó la columna SPXLFF para carga mediante lavados secuenciales con tampón de regeneración (NaOH 0,5 N) seguido de tampón de equilibrado (MES 30 mM / NaCl 45 mM, pH 5.6). La columna después se cargó con conjunto de proteína A ajustado a un pH de  $5,60 \pm 0,05$  y una conductividad de  $5,8 \pm 0,2$  mmhos. La columna se lavó usando un gradiente lineal de sal, esencialmente como se ilustra en la Figura 2. Antes de comenzar el gradiente lineal, se mezcló  
10 tampón de elución (MES 30 mM, NaCl 100 mM, pH 5,6) con tampón de equilibrado para producir un tampón de lavado inicial que comprendía aproximadamente un 26 % de tampón de elución. La pendiente del gradiente lineal se varió en diferentes experimentos, con velocidades de aumento de concentración de sal de NaCl 1 mM/volumen de columna (VC), 2 mM/CV y 3 mM/CV usado. El gradiente lineal continuó hasta que se midió una DO de 0,6 a 280 nm en el flujo a través. A continuación se lavó la columna con 1 VC del último tampón de lavado.

15 Se eluyó a continuación rhuMAb HER2 de la columna con tampón de elución (MES 30 mM / NaCl 100 mM, pH 5.6). Después de la elución, la columna se regeneró con tampón de regeneración (NaOH 0,5 N).

20 Como puede observarse en la Tabla 1, el rendimiento de etapa varió en función de la pendiente y de la masa de carga.

Tabla 1: Rendimiento de etapa en función de pendiente del gradiente y masa de carga

Pendiente	15 mg/ml	30 mg/ml	45 mg/ml
1 mM/VC	83 %	85 %	90 %
2 mM/VC	81 %	81 %	84 %
3 mM/VC	69 %	73 %	77 %

25 La pureza se midió en términos de variantes ácidas mediante HPIEC Dionex. Como puede observarse en la Tabla 2, la pureza aumentó generalmente con una pendiente de gradiente en aumento. La carga comprendía un 17 % de variantes ácidas en todas las clases.

Tabla 2: Resultados de pureza de HPIEC Dionex; % de variantes ácidas

Pendiente	15 mg/ml	30 mg/ml	45 mg/ml
1 mM/VC	7 %	12 %	14 %
2 mM/VC	4 %	7 %	10 %
3 mM/VC	2 %	4 %	7 %

### Ejemplo 2

30 Se preparó una columna de SPXLFF, como se describe anteriormente, para carga mediante lavados secuenciales con tampón de regeneración (NaOH 0,5 N) seguido de tampón de equilibrado (MES 30 mM / Na/HOAc 70 mM, pH 5.5). La columna después se cargó con conjunto de proteína A ajustado a un pH de  $5,60 \pm 0,05$  y una conductividad de  $5,8 \pm 0,2$  mmhos.

35 Después de la carga, la columna se lavó usando un gradiente de sal multipendiente con tres segmentos distintos, teniendo cada uno una pendiente menor de manera progresiva, esencialmente como se ilustra en la Figura 3. Los parámetros del gradiente se muestran en la Tabla 3 más adelante.

40 El lavado comenzó con un aumento inicial paso a paso en la concentración de sal del tampón de equilibrado para formar el tampón de lavado inicial. El tampón de lavado inicial se creó mezclando tampón de elución (MES 30 mM, Na/HOAc 145 mM, pH 5,5) con tampón de equilibrado para producir un tampón que comprendía un 26 % de tampón de elución. Durante el primer segmento de gradiente lineal, la columna se lavó con aproximadamente 4,9 volúmenes de columna de tampón de lavado, durante el cual el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado aumentó a  
45 una velocidad de aproximadamente un 5,71 % por volumen de columna. Por tanto, al final del primer segmento de gradiente lineal, el tampón de lavado comprendía aproximadamente el 54 % del tampón de elución.

Durante el segundo segmento de gradiente lineal se hicieron pasar 2,0 volúmenes de columna sobre la columna. Durante este segmento, el porcentaje de tampón de elución aumentó a una velocidad del 3,5 %. Por tanto, al final del  
50 segundo segmento, el tampón de lavado comprendía un 61 % del tampón de elución.

Finalmente, durante el tercer segmento de gradiente lineal se hicieron pasar 6,1 volúmenes de columna sobre la columna. Con el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado aumentando a una velocidad de un 2,13 % por volumen de columna. El tercer segmento de gradiente lineal terminó cuando se midió una DO de 0,6 a 280 nm en el flujo a través. En este punto, el tampón de lavado comprendía aproximadamente el 74 % del tampón de elución.  
55

Después del tercer segmento de gradiente lineal, se hizo pasar un volumen fijo del tampón final de lavado (es decir, un

74 % de tampón de elución) sobre la columna. Se usaron volúmenes finales de 0,8, 0,6 y 0,4 en diferentes experimentos.

Se eluyó a continuación rhuMAb HER2 de la columna con tampón de elución (MES 30 mM / NaHOAc 145 mM, pH 5.5). Después de la elución, la columna se regeneró con tampón de regeneración (NaOH 0,5 N).

Tabla 3: Parámetros del gradiente

	% de tampón de elución (extremo del segmento)	Volumen total de lavado al final del segmento (volúmenes de columna)	Volumen total de segmento (VC)	Pendiente % de tampón de elución / VC
Comienzo del gradiente	26 %	0	0	
Segmento 1	54 %	4,9	4,9	5,71 %
Segmento 2	61 %	6,9	2,0	3,50 %
Segmento 3	74 %	13	6,1	2,13 %

Se evaluó el efecto de la carga de rhuMAb HER2 y el volumen de retardo de lavado final sobre la recuperación de producto y calidad del producto. Los resultados presentados en las Tablas 4 y 5 muestran que es posible lograr un rendimiento consistente y la retirada de variantes ácidas en un intervalo de carga amplio usando un lavado de gradiente multipendiente. Además, los resultados demuestran que la compensación entre rendimiento y pureza puede refinarse según sea necesario ajustando el volumen de retardo de lavado final después de lograrse una DO de 0,6.

Como puede observarse en la Tabla 4, para un volumen de retardo de lavado final dado, el rendimiento de etapa no varía significativamente. Un mayor volumen de retardo de lavado final disminuye en cierto modo el rendimiento en todas las masas de carga. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5, aumentar el volumen de retardo de lavado final aumenta la pureza de la proteína eluida. Por tanto, un experto en la técnica será capaz de seleccionar un volumen de retardo de lavado final que logre el rendimiento y la pureza deseados.

Tabla 4: Rendimiento de etapa en función del volumen de retardo de lavado y masa de carga

	15 mg/ml	30 mg/ml	45 mg/ml
0,8 VC	79 %	80 %	81 %
0,6 VC	80 %	81 %	83 %
0,4 VC	83 %	84 %	85 %

Tabla 5: Pureza de HPIEC Dionex; % de variantes ácidas

	15 mg/ml	30 mg/ml	45 mg/ml
0,8 VC	6 %	7 %	9 %
0,6 VC	8 %	10 %	11 %
0,4 VC	10 %	11 %	12 %
Basándose en la carga de variantes ácidas al 19 %.			

Mediante el uso de un gradiente multipendiente con tres segmentos, teniendo cada uno una pendiente menor de manera progresiva, pueden lograrse un rendimiento y pureza consistentes a lo largo de un intervalo de carga amplio. Entre los intervalos de 15 a 45 mg de anticuerpo por ml de resina, hay poca variación en el rendimiento o la calidad de rhuMAb HER2 recuperado en el conjunto de elución para un volumen de retardo de lavado de columna dado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

<130> HMK/FP6726848

<140> EP

<141> 2003-09-08

<150> EP 03795664.6

<151> 08/09/2003

<150> PCT/US2003/028064

<151> 08/09/2003

ES 2 527 616 T3

<150> US 60/410334  
 <151> 11/09/2002

<160> 2

5

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1  
 <211 > 214

10

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

15

<400> 1

```

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

20

<210> 2  
 <211 > 449  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Ala Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 Gly

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para purificar un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y contaminantes, en el que el polipéptido es un anticuerpo que se une a HER2 y en el que los contaminantes comprenden una variedad desamidada del anticuerpo, y en donde el método comprende las etapas secuenciales de:
- 5 (a) cargar la composición sobre una resina de intercambio catiónico con un tampón de equilibrado que tiene una primera concentración de sal;
- 10 (b) lavar la resina de intercambio catiónico con un tampón de lavado hasta que se mide una concentración predeterminada de proteína en el flujo a través, en donde la concentración de sal del tampón de lavado aumenta desde una segunda concentración de sal inicial que es mayor que la concentración de sal del tampón de equilibrado, a una tercera concentración final de sal;
- 15 (c) hacer pasar un volumen fijo de 0,4 a 1 volumen de columna de tampón de lavado a la tercera concentración final de sal sobre la resina de intercambio catiónico; y
- (d) eluir el polipéptido de la resina de intercambio catiónico con tampón de elución que tiene una concentración de sal que es mayor que la concentración final de sal del tampón de lavado.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la resina de intercambio catiónico comprende carboximetilcelulosa o sulfopropilo inmovilizado sobre agarosa.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEC ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEC ID N°: 2.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es rhuMAb HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEC ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEC ID N°: 2, y en el que los contaminantes comprenden una variante desamidada que tiene Asn3O en CDR1 de una o ambas regiones V<sub>L</sub> del mismo convertido a aspartato.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se produce de manera recombinante en células hospedadoras CHO.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo se produce intracelularmente y se separa de restos en partículas de las células hospedadoras mediante centrifugación o ultrafiltración antes de la cromatografía de intercambio iónico.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se somete a cromatografía de proteína A antes de la cromatografía de intercambio catiónico.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la cantidad de anticuerpo en la composición cargada sobre la resina de intercambio iónico es de 15 mg a 45 mg por ml de resina de intercambio catiónico.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la concentración predeterminada de proteína en la etapa (b) corresponde a una DO de 0,6 medida a 280 nm.
- 45 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tampón de lavado comprende una mezcla de tampón de equilibrado y tampón de elución, y en el que el aumento en la concentración de sal del tampón de lavado durante la etapa (b) se logra aumentando la proporción de tampón de elución en el tampón de lavado.
- 50 11. El método de la reivindicación 10 en el que la proporción de tampón de elución en el tampón de lavado aumenta a una velocidad constante.
12. El método de la reivindicación 10 en el que el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado aumenta a dos o más velocidades diferentes durante el trascurso del lavado en la etapa (b).
- 55 13. El método de la reivindicación 12 en el que el porcentaje de tampón de elución en el tampón de lavado aumenta a una primera velocidad durante un primer segmento del lavado, a una segunda velocidad durante un segundo segmento del lavado y a una tercera velocidad durante un tercer segmento del lavado.
- 60 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tampón de elución comprende Na 145 mM/HOAc y el tampón de equilibrado comprende Na 70 mM/HOAc, o en el que el tampón de elución comprende NaCl 100 mM y el tampón de equilibrado comprende NaCl 45 mM.
- 65 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende someter a la composición que comprende al polipéptido a una o más etapas de purificación adicionales para obtener una preparación homogénea del polipéptido.

16. El método de la reivindicación 15, que además comprende preparar una composición farmacéutica combinando la preparación homogénea del polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 17. El método de la reivindicación 15, que además comprende conjugar el polipéptido purificado con una molécula heteróloga.

18. El método de la reivindicación 17, en el que la molécula heteróloga es polietilenglicol, un marcador o un agente citotóxico.

## CADENA LIGERA

1                   15                   30                   45  
 DIQMTQSPSSLSASVGD<sup>15</sup>RVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPK<sup>45</sup>  
 46                   60                   75                   90  
 LIYSASF<sup>46</sup>LYSGVPSR<sup>60</sup>FSGSRSGTDFTLT<sup>75</sup>ISSLPEDFATYYCQQ<sup>90</sup>  
 91                   105                   120                   135  
 HYTTPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI<sup>91</sup>FPSPDEQLKSGTASVVC<sup>135</sup>L  
 136                   150                   165                   180  
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<sup>136</sup>STYLS<sup>165</sup>STLT<sup>180</sup>  
 181                   195                   210                   214  
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<sup>181</sup>

FIGURA 1A



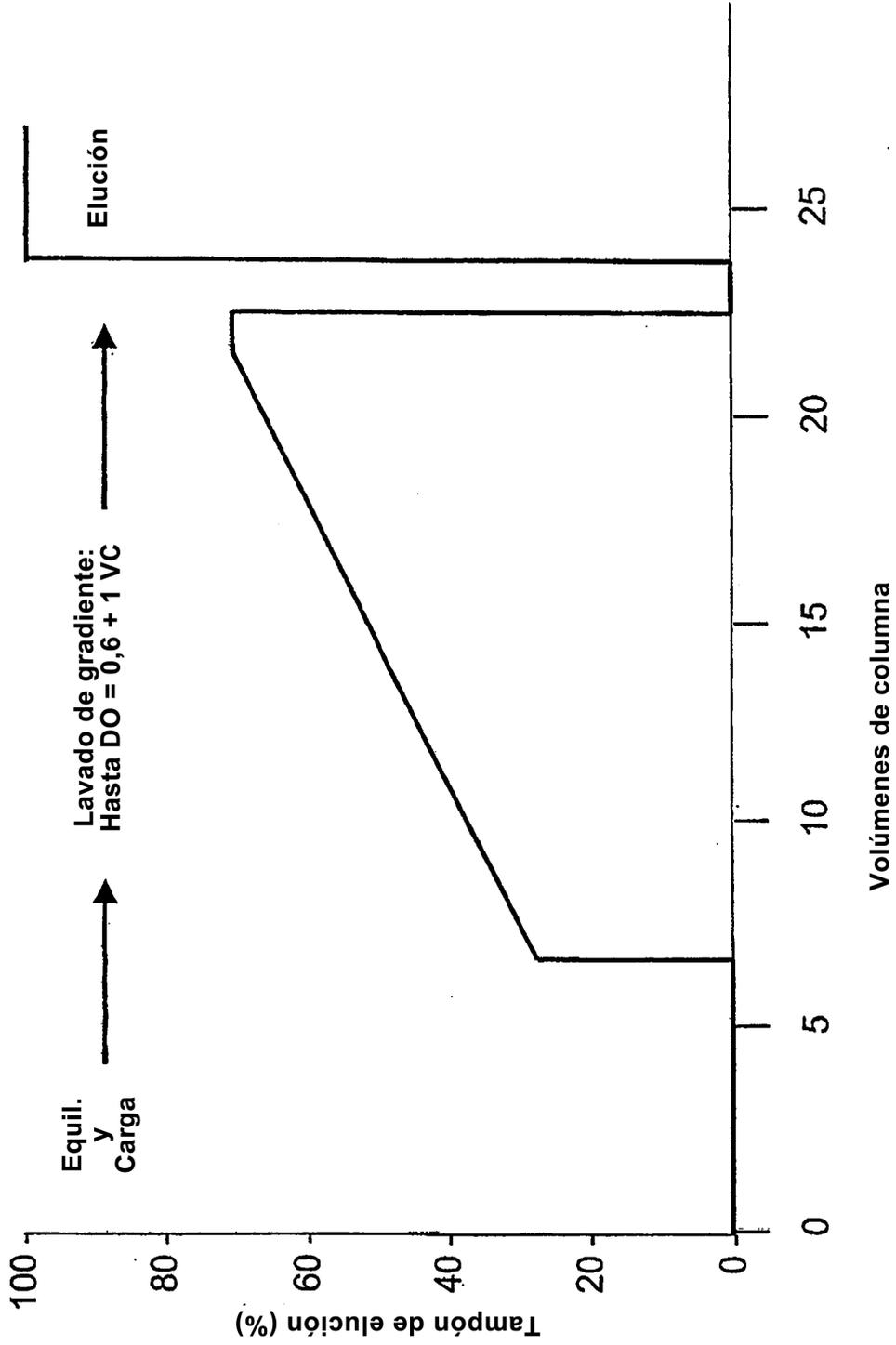


Figura 2

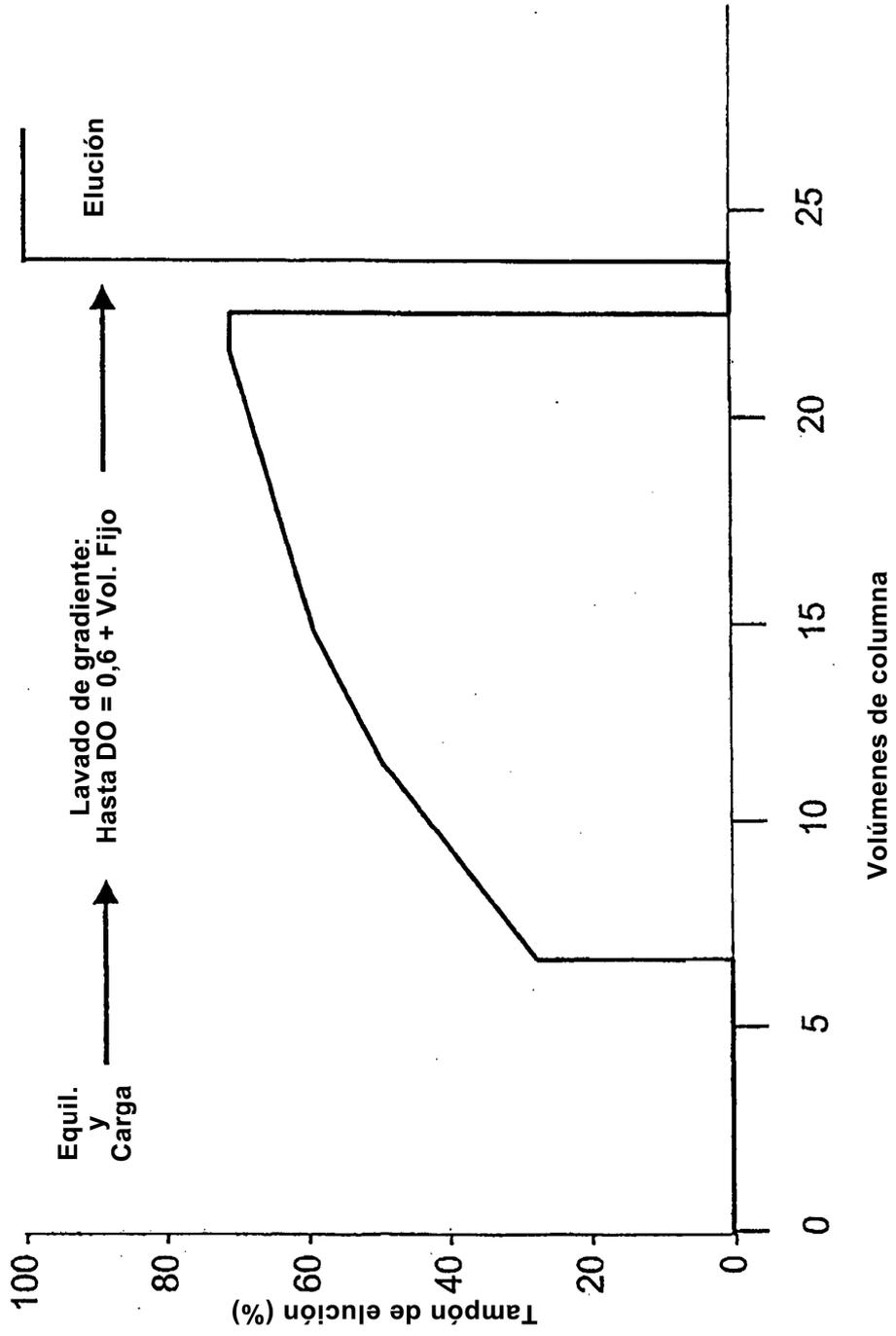


Figura 3