

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 266**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08844379 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2215117**

54 Título: **Purificación de anticuerpos mediante cromatografía de intercambio catiónico**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 983825 P

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

08.04.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**LEBRETON, BENEDICTE ANDREE;
O'CONNOR, DEBORAH ANN;
SAFTA, AURELIA y
SHARMA, MANDAKINI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 266 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 mediante cromatografía de intercambio catiónico

5 **Solicitudes relacionadas****Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere en líneas generales a la purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a un método para purificar anticuerpos de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante usando cromatografía de intercambio catiónico, donde se usa una etapa de lavado a alto pH para retirar los contaminantes antes de eluir el anticuerpo deseado usando un tampón de elución con conductividad aumentada.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

La purificación económica a gran escala de proteínas es un problema cada vez más importante para la industria de biotecnología. Generalmente, las proteínas se producen por cultivo celular, usando líneas celulares eucariotas o procariontes modificadas por ingeniería para producir la proteína de interés por inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Como las células normalmente usadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos, y factores de crecimiento, habitualmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células a una pureza suficiente para su uso como agente terapéutico humano supone un reto formidable.

Los procedimientos para la purificación de proteínas de los desechos celulares inicialmente dependen de la expresión de la proteína. Algunas proteínas pueden encapsularse para secretarse desde la célula al medio de cultivo adyacente; otras pueden prepararse de forma intracelular. Para las últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que puede hacerse mediante diversos métodos, incluyendo corte mecánico, choque osmótico, o tratamientos enzimáticos. Dicha alteración libera los contenidos completos de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se retiran por centrifugación diferencial o por filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y liberación de las proteínas intracelulares de la célula hospedadora en el trascurso del proceso de producción de proteínas.

Una vez se ha obtenido una solución aclarada que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula se intenta habitualmente usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobicidad, o tamaño. Están disponibles varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, que permiten la adaptación precisa del esquema de purificación a la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que puede causarse que las proteínas se muevan a diferentes velocidades a lo largo de una columna, consiguiendo una separación física que aumenta según pasan bajando por la columna, o se adhieran selectivamente al medio de separación, eluyéndose entonces de forma diferencial por diferentes disolventes. 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 "flujo continuo".

50 La cromatografía de intercambio iónico es una técnica cromatográfica que se usa habitualmente para la purificación de proteínas. En cromatografía de intercambio iónico, parches cargados sobre la superficie del soluto se atraen por cargas opuestas unidas a la matriz de cromatografía, con la condición de que la fuerza iónica del tampón que rodea sea baja. La elución se consigue generalmente aumentando la fuerza iónica (es decir la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y de ese modo alterar la carga del soluto es otro modo de conseguir la elución del soluto. El cambio en la conductividad o pH puede ser gradual (elución en gradiente) o por etapas (elución en etapas). En el pasado, estos cambios han sido progresivos; es decir, el pH o la conductividad se aumenta o disminuye en una única dirección

60 Las patentes de Estados Unidos N° 6.339.142, 6.417.355, 6.489.447, y 7.074.404 (Basey et al.) describen cromatografía de intercambio iónico para purificar polipéptidos. Las patentes de Estados Unidos N° 6.127.526, 6.333.398, y 6.797.814 (Blank, G.) describen purificación de proteínas, tales como anticuerpos anti-HER2, por cromatografía en proteína A. Los métodos para purificar proteínas, tales como anticuerpos, por cromatografía de intercambio iónico se describen en la publicación de solicitud de Estados Unidos N° 2004/0082047.

65 La patente de Estados Unidos N° 5.110.913 se refiere a la purificación de un anticuerpo en una solución acuosa uniendo el anticuerpo a una resina de intercambio iónico a un primer pH de 4,6, lavando a un segundo pH de 5,5, y

eluyendo el anticuerpo a pH 6,5, donde la fuerza iónica de las soluciones de estas tres etapas permanece constante. Zhang *et al.* se refieren a cromatografía de intercambio aniónico en membrana Q de un anticuerpo humano (Zhang *et al.* "Q Membrane Chromatography Application for Human Antibody Purification Process," Póster presentado en BioProduction, Oct. 26-27, Múnich, Alemania, 2004). Otras publicaciones referentes a la purificación de proteínas incluyen: Barnthouse *et al.* J. Biotech. 66: 125-136 (1998); Blank *et al.* Bioseparation 10: 65-71 (2001); Follman y Fahrner J. Chromatog. 1024: 79-85 (2004); Iyer *et al.* BioPharm 15(1):14-16, 18, 20, 53 (2002); documento US 2004/0082047A1; documento EP 333.574; documento EP 460.426 B1; documento EP 556.083; documento WO 89/05157; documento WO 92/22653; documento WO 93/06217; documento WO 95/22389; documento WO 96/33208; documento WO 96/40883; documento US 4.753.894; documento US 4.966.851; documento US 5.110.913; documento US 5.112.951; documento US 5.115.101; documento US 5.118.796; documento US 5.169.774; documento US 5.196.323; documento US 5.256.769; documento US 5.279.823; documento US 5.429.746; documento US 5.451.662; documento US 5.525.338; documento US 5.677.171; documento US 6.005.081; documento US 6.054.561; documento US 6.127.526; documento US 6.267.958; documento US 6.339.142; documento US 6.417.335; documento US 6.489.447; Adachi *et al.*, Journal of Chromatography. A. 763 (1-2): 57-63 (Feb 28, 1997); Gagnon, P. Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Tucson: Validated Biosystems, Inc., Capítulo 4, pág. 57-86 (1996); Graf *et al.*, Bioseparation 4(1):7-20 (Feb 1994); Mhatre *et al.*, Journal of Chromatography A 707(2):225-231 (Jul 21, 1995); Neidhardt *et al.*, Journal of Chromatography 590(2): 255-261 (1992); Protein Purification Applications - A Practical Approach, Harris y Angal, IRL Press pág. 151-156 (1995); Sofer *et al.* Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-up, and Validation, San Diego: Academic Press pág. 65-80 (1997); Tishchenko *et al.*, Journal of Chromatography B 706(1):157-166 (Feb 27, 1998).

Sumario de la invención

La invención de este documento se refiere a un método mejorado para cromatografía de intercambio catiónico de anticuerpos en que se usa una etapa de lavado a alto pH para retirar los contaminantes antes de eluir el producto deseado de anticuerpo. El proceso provoca, entre otras cosas, una eliminación mejorada de contaminantes de proteínas de ovario de hámster chino (CHOP).

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un método para purificar un anticuerpo de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:

- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico donde la composición está a un primer pH de 4,0 a 6,0;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado a un pH que es mayor que el de la composición en (a), donde el pH del primer tampón de lavado es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 9,0;
- (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado a un pH que es menor que el del primer tampón de lavado: donde el pH del segundo tampón de lavado es de 5,0 a 6,0
- (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico con un tampón de elución a una conductividad que es sustancialmente mayor que la del segundo tampón de lavado.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a CD20 humana, tal como rituximab, o se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), tal como bevacizumab.

De acuerdo con una realización preferida, la invención se refiere a un método para purificar un anticuerpo que se une a CD20 humana de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados entre el grupo que consiste en proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN, y anticuerpos agregado contra CD20, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:

- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico donde la composición está a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado a un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 9,0;
- (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y
- (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico usando un tampón de elución con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y una conductividad de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mS/cm. Preferiblemente el anticuerpo contra CD20 es rituximab.

De acuerdo con otra realización preferida, la invención se refiere a un método para purificar un anticuerpo que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados entre el grupo que consiste en un componente de medio de cultivo, gamicina, proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), ADN, contaminante viral, y anticuerpo agregado contra VEGF, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:

- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico donde la composición está a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado a un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 8,0;
- (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y
- (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico usando un tampón de elución con un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y una conductividad de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mS/cm. Preferiblemente, el anticuerpo contra VEGF es bevacizumab.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID N° 1) y cadena ligera (SEC ID N° 2) del anticuerpo rituximab. Cada una de las regiones flanqueantes (FR1-4) y cada una de las regiones CDR (CDR1-3) en cada región variable están identificadas, que son la secuencia constante de cadena pesada gamma 1 humana y secuencia constante de cadena ligera kappa humana. La región pesada variable (VH) está en la SEC ID N° 3. La región ligera variable (VL) está en la SEC ID N° 4. Los identificadores de secuencia para las CDR son: CDR H1 (SEC ID N° 5), CDR H2 (SEC ID N° 6), CDR H3 (SEC ID N° 7), CDR L1 (SEC ID N° 8), CDR L2 (SEC ID N° 9), y CDR L3 (SEC ID N° 10).

Las Figuras 2A y 2B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID N° 11) y cadena ligera (SEC ID N° 12) del anticuerpo bevacizumab. El extremo de cada región variable está indicado con ||. La región pesada variable (VH) está en la SEC ID N° 13. La región ligera variable (VL) está en la SEC ID N° 14. Cada una de las tres CDR en cada región variable está subrayada. Los identificadores de secuencia para las CDR son: CDR H1 (SEC ID N° 15), CDR H2 (SEC ID N° 16), CDR H3 (SEC ID N° 17), CDR L1 (SEC ID N° 18), CDR L2 (SEC ID N° 19), y CDR L3 (SEC ID N° 20).

La Figura 3 proporciona una comparación lado a lado de la eliminación de proteínas de la célula hospedadora por el proceso de cromatografía de intercambio catiónico del proceso mejorado de rituximab en comparación con el proceso original. Se consiguió eliminación superior de CHOP con el nuevo proceso.

Descripción detallada de la realización preferida

Definiciones:

En este documento, los intervalos numéricos o cantidades precedidos por el término "aproximadamente" incluyen expresamente el intervalo exacto o cantidad numérica exacta.

La "composición" a purificar en este documento comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes. Las composición puede estar "parcialmente purificada" (es decir, se ha sometido a una o más etapas de purificación) o puede obtenerse directamente de una célula u organismo hospedador que produce el anticuerpo (por ejemplo, la composición puede comprender fluido recogido de cultivo celular).

Como se usa en este documento, "polipéptido" se refiere en líneas generales a péptidos y proteínas que tienen más de diez aminoácidos. Preferiblemente, el polipéptido es una proteína de mamífero, ejemplos de la cual incluyen: renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de hormona del crecimiento; hormona paratiroides; hormona estimuladora de tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrand; factores anti-coagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensorioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa o activador de plasminógeno (t-PA) de orina humana o tipo tisular; bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral-alfa y -beta; encefalinasa; RANTES (regulada en activación normalmente expresada y secretada por células T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; pro-relaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de 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 NGF-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-β, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento tipo insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD 19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y - gamma; factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleuquinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas superficiales de membrana; factor de aceleración del deterioro; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la

- envuelta del SIDA; proteínas de transporte; receptores mensajeros; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Un polipéptido preferido es un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo que se une a CD20 humana, por ejemplo, rituximab; o un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), por ejemplo bevacizumab.
- Un "contaminante" es un material que es diferente del producto de anticuerpo deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula hospedadora, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente de medio de cultivo celular (por ejemplo, garamicina; GENTAMYCIN®) etc.
- La expresión "material de intercambio catiónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para intercambio con cationes en una solución acuosa pasada sobre o a través de la fase sólida. La carga puede proporcionarse uniendo uno más ligandos cargados a la fase sólida, por ejemplo por unión covalente. Como alternativa, o adicionalmente, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, como es el caso para sílice, que tiene una carga global negativa). Materiales de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen carboxi-metil-celulosa, BAKERBOND ABX™, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare), CAPTO S™ (GE Healthcare), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™, y FRACTOPREP™ (EMD Merck), sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare), y SUPER SP™ (Tosoh Biosciences). Un material preferido de intercambio catiónico en este documento comprende partículas de flujo continuo de poli(estireno-divinilbenceno) reticulado (fase sólida) recubiertas con un polímero polihidroxilado funcionalizado con grupos sulfopropilo (por ejemplo, resina de cromatografía POROS 50 HS®).
- Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la cual se pueden adherir uno o más ligandos cargados. La fase sólida puede ser una columna de purificación (incluyendo, sin limitación, columnas de lecho expandido y de lecho compactado), una fase discontinua de partículas discretas, una membrana, o filtro etc. 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(estireno-divinilbenceno), poliacrilamida, partículas cerámicas y derivados de cualquiera de los anteriores.
- El término "carga" en este documento se refiere a la composición cargada en el material de intercambio catiónico. Preferiblemente, el material de intercambio catiónico se equilibra con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se tiene que purificar.
- Un "tampón" es una solución que resiste cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Se describen diversos tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón en Buffers. A Guide for the RepARATION and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., Ed. Calbiochem Corporation (1975).
- Un "tampón de equilibrado" es un tampón que se usa para equilibrar el material de intercambio catiónico, antes de cargar la composición que comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes en el material de intercambio catiónico. Preferiblemente el pH del tampón de equilibrado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, preferiblemente aproximadamente 5,5. Preferiblemente, la conductividad del tampón de equilibrado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 mS/cm, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 mS/cm. Opcionalmente, el tampón de equilibrado comprende una sal, tal como NaCl, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 80 mM, preferiblemente NaCl aproximadamente 60 mM.
- La expresión "tampón de lavado" se usa en este documento para hacer referencia al tampón que se pasa sobre el material de intercambio catiónico después de cargar una composición y antes de la elución de la proteína de interés. El tampón de lavado puede servir para retirar uno o más contaminantes del material de intercambio catiónico, sin elución sustancial del producto de anticuerpo deseado. De acuerdo con la realización preferida de la invención de este documento se usan un "primer tampón de lavado" y un "segundo tampón de lavado".
- En este documento, la expresión "primer tampón de lavado" se refiere a un tampón de lavado que tiene un pH aumentado respecto al pH de la carga y/o tampón de equilibrado. El primer tampón de lavado puede usarse en este documento para eluir uno o más contaminantes del material de intercambio catiónico, sin eluir sustancialmente el producto de anticuerpo de interés del mismo. El término "primero" no debe interpretarse como excluyente del uso de uno o más tampones adicionales de lavado u otros tampones entre la carga y el primer tampón de lavado. El pH del primer tampón de lavado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 9,0,

preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, y mucho más preferiblemente pH aproximadamente 7,0 o pH aproximadamente 7,8. Preferiblemente, la conductividad del primer tampón de lavado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mS/cm, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 mS/cm. Opcionalmente, el primer tampón de lavado está sustancialmente libre de sal (tal como NaCl) en el mismo.

La expresión "segundo tampón de lavado" para los propósitos de esta solicitud se refiere a un tampón de lavado usado después del primer tampón de lavado para preparar el material de intercambio catiónico para elución del anticuerpo de interés. El término "segundo" no debe interpretarse como excluyente del uso de uno o más tampones adicionales de lavado u otros tampones entre el primer tampón de lavado y el segundo tampón de lavado. El pH del segundo tampón de lavado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, preferiblemente aproximadamente 5,5, y mucho más preferiblemente pH 5,5. Preferiblemente, la conductividad del segundo tampón de lavado de este documento está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mS/cm, preferiblemente aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mS/cm, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 mS/cm.

El "tampón de elución" se usa para eluir el anticuerpo de interés de la fase sólida. En este documento, el tampón de elución tiene una conductividad sustancialmente aumentada respecto a la del segundo tampón de lavado, de modo que el producto de anticuerpo deseado eluya del material de intercambio catiónico. La conductividad del tampón de elución es sustancialmente mayor que la de la carga y de cada uno de los tampones precedentes, concretamente del tampón de equilibrado, primer tampón de lavado, y segundo tampón de lavado. Por conductividad "sustancialmente mayor" se entiende, por ejemplo, que el tampón tiene una conductividad que es al menos 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de conductividad (mS/cm) mayor que la de la composición o tampón con que se está comparando. En una realización, el pH del tampón de elución es sustancialmente igual al del tampón de equilibrado y/o segundo tampón de lavado. Preferiblemente el pH del tampón de elución de este documento está en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, preferiblemente aproximadamente 5,5, y mucho más preferiblemente pH 5,5. Preferiblemente, la conductividad del tampón de elución de este documento está en el intervalo de aproximadamente 10 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 12 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 mS/cm. La conductividad aumentada puede conseguirse mediante la adición de una sal, tal como cloruro sódico, acetato sódico, cloruro potásico al tampón de elución. Preferiblemente, el tampón de elución comprende NaCl aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mM, preferiblemente NaCl aproximadamente 150 mM a aproximadamente 200 mM, por ejemplo NaCl aproximadamente 175 mM o NaCl aproximadamente 160 mM.

Puede usarse un "tampón de regeneración" para regenerar el material de intercambio catiónico de modo que pueda volver a usarse. El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH necesarios para retirar sustancialmente todos los contaminantes y el anticuerpo de interés del material de intercambio catiónico.

El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por transporte de iones. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presente en la solución acuosa, la solución tendrá una mayor conductividad. La unidad básica de medida para la conductividad es el Siemen (o mho), mho (mS/cm), y puede medirse usando un medidor de conductividad, tal como diversos modelos de medidores de conductividad Orion. Como la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en solución de portar corriente eléctrica, la conductividad de una solución puede alterarse cambiando la concentración de los iones en la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponante y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro sódico, acetato sódico, o cloruro potásico) en la solución pueden alterarse para conseguir la conductividad deseada. Preferiblemente, la concentración salina de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada.

Por "purificar" un anticuerpo de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes se entiende aumentar el grado de pureza del anticuerpo en la composición retirando (completa o parcialmente) al menos un contaminante de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso global de purificación que produce una composición "homogénea". "Homogénea" se usa en este documento para hacer referencia a una composición que comprende al menos aproximadamente el 70 % en peso del anticuerpo de interés, basado en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente el 80 % en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 % en peso, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % en peso.

Por "unir" una molécula a un material de intercambio catiónico se entiende exponer la molécula al material de intercambio catiónico en condiciones apropiadas (pH y/o conductividad) de modo que la molécula se inmovilice de forma reversible en o sobre el material de intercambio catiónico en virtud de interacciones iónicas entre la moléculas y un grupo cargado o grupos cargados del material de intercambio catiónico.

Por "lavar" el material de intercambio catiónico se entiende pasar un tampón apropiado a través de o sobre el material de intercambio catiónico.

Por "eluir" una molécula (por ejemplo, anticuerpo o contaminante) de un material de intercambio catiónico se entiende retirar la molécula del mismo.

En realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo a purificar en este documento es un anticuerpo recombinante. Un "anticuerpo recombinante" es uno que se ha producido en una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado con ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o produce el anticuerpo como resultado de recombinación homóloga. "Transformación" y "transfección" se usan de forma intercambiable para hacer referencia al proceso de introducir ácido nucleico en una célula. Después 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 celular *in vitro* así como una célula dentro de un animal hospedador. Se describen métodos para producción recombinante de polipéptidos en la patente de Estados Unidos N° 5.534.615, por ejemplo.

Una "variante" o "variante de secuencia de aminoácidos" de un polipéptido de partida es un polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido de partida. Generalmente, una variante poseerá al menos un 80 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 90 % de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de secuencia, y mucho más preferiblemente al menos un 98 % de identidad de secuencia con el polipéptido nativo. El porcentaje de identidad de secuencia se determina, por ejemplo, por 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 la máxima homología. Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el ADN que codifica el polipéptido, o por síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácido también pueden alterar el procesamiento post-traducciona del polipéptido, tal como cambiando la cantidad o posición de los sitios de glucosilación. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo, treonilo o tirosilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)). Se describen métodos para generar variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos en la patente de Estados Unidos N° 5.534.615, por ejemplo.

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

El anticuerpo de este documento está dirigido contra un "antígeno" de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede producir un efecto terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor; véase la patente de Estados Unidos 5.091.178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Antígenos ejemplares incluyen aquellos polipéptidos analizados anteriormente. Dianas moleculares preferidas para anticuerpos incluyen polipéptidos CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER tales como el receptor de EGF (HER1), receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina α v/ β 3 incluyendo cualquiera de las subunidades a o b de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C etc. Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de éstos (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 cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

Ejemplos of anticuerpos a purificar en este documento incluyen, pero sin limitación: anticuerpos contra HER2 incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992), patente de Estados Unidos N° 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO01/00245); anticuerpos contra CD20 (véase a continuación); anticuerpos contra IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993), y publicación internacional N° WO 95/23865); anticuerpos contra VEGF o el receptor de VEGF incluyendo anticuerpos humanizados y/o de afinidad madurada contra VEGF tales como el anticuerpo humanizado huA4.6.1 contra VEGF bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), publicación internacional N° WO 96/30046, y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos contra PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos contra CD11a incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (patente de Estados Unidos N° 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991), y Hourmant et al.,

Transplantation 58:377-380 (1994)); anticuerpos que se unen a IgE incluyendo omalizumab (XOLAIR®) (Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993), y publicación internacional N° WO 95/19181; patente de Estados Unidos N° 5.714.338, expedida el 3 de febrero de 1998 o patente de Estados Unidos N° 5.091.313, expedida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o publicación internacional N° WO99/01556 presentada el 30 de junio de 1998, patente de Estados Unidos N° 5.714.338); anticuerpos contra CD18 (patente de Estados Unidos N° 5.622.700, expedida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpos contra el receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos contra el factor tisular (TF) (patente europea N° 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos contra integrina $\alpha_4\text{-}\alpha_7$ (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos contra EGFR (por ejemplo, anticuerpo quimerizado o humanizado 225, cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos contra CD3 tales como OKT3 (patente de Estados Unidos N° 4.515.893 expedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos contra CD25 o Tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (véase la patente de Estados Unidos N° 5.693.762 expedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos contra CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos contra CD52 tales como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)); anticuerpos contra el receptor Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey et al. Cancer Res. 55 (23Supl.): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman et al. Cancer Res. 55(23 Sup.): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996)); anticuerpos contra CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos contra CD33 tales como Hu M195 (Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Supl.): 5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos contra EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos contra GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos contra RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos contra CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos contra VIH tales como PRO542; anticuerpos contra hepatitis tales como el anticuerpo contra Hep B OSTAVIR®; anticuerpo contra CA 125 OvaRex; anticuerpo BEC2 contra epítipo GD3 idiótipo; anticuerpo contra $\alpha\text{v}\beta_3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo contra carcinoma de células renales humanas tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1 An humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo R24 anti-melanoma humano dirigido contra gangliósido GD3; anticuerpo anti-carcinoma humano de células escamosas (SF-25); anticuerpo contra antígeno de leucocitos humanos (HLA) tal como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo contra CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo contra IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti-células B (Impheron); MAb dirigido a células B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo contra Lym-1, tal como Lym-1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo contra BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo contra el receptor de BAFF (véase por ejemplo, el documento WO 02/24909); anticuerpo contra BR3; anticuerpo contra Blys tal como belimumab; LYMPHOSTAT - B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticuerpo contra el receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo contra IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo contra el receptor de quimioquinas, tal como un anticuerpo contra CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millieneum); anticuerpo anti-complemento, tal como anticuerpo contra C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo contra IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticuerpos contra CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpos contra TNF- α incluyendo cA2 o infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), fragmento pegilado de anticuerpo contra TNF- α tal como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (por ejemplo, PassTNF; Verigen); anticuerpos contra CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 y epratuzumab 1-131, anticuerpo contra CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH), y LympoScan Tc99 (Immunomedics). Preferiblemente, el anticuerpo que se purifica en este documento es un anticuerpo intacto desnudo que se une a CD20 humana, o un anticuerpo intacto desnudo que se une a VEGF humano.

El antígeno "CD20" humano, o "CD20," es una fosfoproteína no glucosilada de aproximadamente 35-kDa encontrada sobre la superficie de más del 90 % de las células B de la sangre periférica u órganos linfoides. CD20 está presente en células B normales así como en células B malignas, pero no se expresa en células madre. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen "antígeno restringido a linfocitos B " y "Bp35". El antígeno CD20 se describe en Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985), por ejemplo.

Una " anticuerpo antagonista de CD20" en este documento es un anticuerpo que, tras unirse a CD20 en células B, destruye o agota las células B en un sujeto y/o interfiere con una o más funciones de células B, por ejemplo, reduciendo o evitando una respuesta humoral provocada por la célula B. El anticuerpo antagonista preferiblemente es capaz de agotar las células B (es decir, reduce los niveles en circulación de células B) en un sujeto tratado con el mismo. Dicho agotamiento puede conseguirse mediante diversos mecanismos tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inhibición de proliferación de células B y/o inducción de muerte de células B (por ejemplo, mediante apoptosis).

Como se usa en este documento, "agotamiento de células B" se refiere a una reducción en los niveles de células B en un animal o ser humano generalmente después de tratamiento con fármaco o anticuerpo, en comparación con el nivel antes del tratamiento. El agotamiento de células B puede ser parcial o completo. Los niveles de células B se pueden medir usando técnicas bien conocidas tales como las descritas en Reff et al., Blood 83: 435-445 (1994), o la patente de Estados Unidos N° 5.736.137 (Anderson et al.). A modo de ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un primate normal) puede tratarse con diversas dosificaciones del anticuerpo o inmunoadhesina, y las concentraciones de células B periféricas pueden determinarse, por ejemplo por un método FACS que cuenta las células B.

Ejemplos de anticuerpos contra CD20 incluyen: "C2B8," que ahora se llama "rituximab" ("RITUXAN®") (patente de Estados Unidos N° 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] denominado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) disponible en el mercado en IDEC Pharmaceuticals, Inc. (patente de Estados Unidos N° 5.736.137; 2B8 depositado en la ATCC con el número de acceso HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a murina "B1," también llamada "Tositumomab," opcionalmente marcada con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "yodo I131 tositumomab" (BEXXAR™) disponible en el mercado en Corixa (véase, también, la patente de Estados Unidos N° 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press et al. Blood 69(2):584-591 (1987) y variantes del mismo incluyendo 1F5 de "región flanqueante parcheada" o humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depósito ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (patente de Estados Unidos N° 5.677.180); 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *et al.*, y como se expone a continuación); 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo completamente humano, de alta afinidad dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de células B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel. Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003) y Cragg et al., Blood 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; documento US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en el documento WO 2004/035607 y el documento US2004/0167319 (Teeling et al.); los anticuerpos que tienen cadenas complejas de azúcar unidas en N-glucósido contra la región Fc descritos en el documento US 2004/0093621 (Shitara et al.); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder et al.) tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25, y MB20-11; moléculas que se unen a CD20 tales como la serie AME de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos AME 33 como se expone en el documento WO 2004/103404 y el documento US2005/0025764 (Watkins et al., Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas que se unen a CD20 tales como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins et al.); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como anticuerpo quimérico o humanizado A20 (cA20, hA20, respectivamente) o IMMUN-106 (documento US 2003/0219433, Immunomedics); anticuerpos que se unen a CD20, incluyendo Leu-16 de epítipo agotado, 1H4, o 2B8, opcionalmente conjugados con IL-2, como en el documento US 2005/0069545A1 y documento WO 2005/16969 (Carr et al.); anticuerpo biespecífico que se une a CD22 y CD20, por ejemplo, hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang et al.); anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles en el International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., En: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma et al. Blood 92:184 (1998)); conjugado de auristatina E anti-CD20 (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); terapia de MAb anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion). Los anticuerpos preferidos contra CD20 en este documento son anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos contra CD20, más preferiblemente rituximab, 2H7 humanizado, 2F2 (Hu-Max-CD20) anticuerpo humano contra CD20 (Genmab), y A20 humanizado o anticuerpo IMMUN-106 (Immunomedics).

Para los propósitos de este documento, los términos "rituximab," "RITUXAN®," y "C2B8" en este documento se refieren a un anticuerpo quimérico recombinante que se une al antígeno CD20 humano como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.736.137, Anderson et al. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende una cadena pesada que comprende CDR H1 (SEC ID N° 5), CDR H2 (SEC ID N° 6), CDR H3 (SEC ID N° 7), y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferiblemente comprende CDR L1 (SEC ID N° 8), CDR L2 (SEC ID N° 9), y CDR L3 (SEC ID N° 10); preferiblemente la cadena pesada comprende una región pesada variable (VH) que comprende la SEC ID N° 3 y una región ligera variable (VL) que comprende la SEC ID N° 4; y mucho más preferiblemente comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N° 1 (con o sin un resto C-terminal de lisina), y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferiblemente comprende la SEC ID N° 2. Las expresiones incluyen expresamente formas variantes tal como se describe en Moorhouse et al. J. Pharm Biomed. Anal. 16:593-603 (1997).

La expresión "VEGF humano" como se usa en este documento se refiere al factor de crecimiento celular del endotelio vascular humano de 165 aminoácidos, y los factores de crecimiento celular del endotelio vascular relacionados de 121, 189, y 206 aminoácidos, como se describe por Leung et al., Science 246:1306 (1989), y Houck et al., Mol. Endocrin. 5:1806 (1991) junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de esos factores de crecimiento.

Los anticuerpos antagonistas anti-VEGF son capaces de inhibir una o más de las actividades biológicas de VEGF, por ejemplo, su actividad mitogénica o angiogénica. Los antagonistas de VEGF actúan interfiriendo con la unión de VEGF a un receptor celular, incapacitando o eliminando células que se han activado por VEGF, o interfiriendo con la activación de células del endotelio vascular después de unión de VEGF a un receptor celular. Todos estos puntos de intervención por un antagonista de VEGF deben considerarse equivalentes.

Para los propósitos de este documento, los términos "bevacizumab," "AVASTIN®," "F(ab)-12," y "rhuMAb VEGF" en este documento se refieren a un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que se une al antígeno factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (rhuMAb VEGF) como se describe en la patente de Estados Unidos N° 7.169.901, Presta et al. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende una cadena pesada que comprende CDR H1 (SEC ID N° 15), CDR H2 (SEC ID N° 16), CDR H3 (SEC ID N° 17), y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferiblemente comprende CDR L1 (SEC ID N° 18), CDR L2 (SEC ID N° 19), y CDR L3 (SEC ID N° 20); mucho más preferiblemente la cadena pesada comprende una región pesada variable (VH) que comprende la SEC ID N° 13 y una región ligera variable (VL) que comprende la SEC ID N° 14; y preferiblemente comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N° 11 (con o sin un resto C-terminal de lisina), y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferiblemente comprende la SEC ID N° 12. Las expresiones incluyen expresamente formas variantes que se forman durante la producción del producto de anticuerpo recombinante.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido 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 minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales (policlonales) de anticuerpo que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567). En una realización adicional, los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse 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) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadena (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales 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 endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal provoca la inhibición completa de producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina humana de la línea germinal en dichos ratones mutantes de la línea germinal provoca la producción de anticuerpos humanos tras 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).

Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en este documento se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido de una "región determinante de 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; Chotia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los restos "flanqueantes" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable como se define en este documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los restos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En

algunos casos, se remplazan restos de la región flanqueante (FR) Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todo o sustancialmente todo lo de los bucles hipervariables corresponde a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todo lo de las regiones FR es de aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es más comparable a la del roedor entonces se acepta como la región flanqueante humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chotia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)).

Otro método usa una región flanqueante particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. Puede usarse la misma región flanqueante para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Están habitualmente disponibles modelos tridimensionales de inmunoglobulina y son familiares para los especialistas en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras confirmaciones tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos FR y combinarse a partir de secuencias receptores y de importación de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos CDR están implicados directamente y de forma muy sustancial en la influencia sobre la unión a antígeno.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Se ha desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían 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, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')₂ se forma usando GCN4 en cremallera de leucina para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los especialistas en la técnica.

En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y 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 estos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios aparezcan con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" cuando se usa en toda 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 ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) 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 diferentes, donde los epítopos son habitualmente de diferentes antígenos. Aunque estas moléculas normalmente se unirán solamente a dos antígenos (es decir anticuerpos biespecíficos, BsAb), se abarcan anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos por esta expresión cuando se usa en este documento. Ejemplos de BsAb 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^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, 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 de células neurales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a carcinoma generalizado (AMOC-31)/anti-CD3; BsAb 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-Ig-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; BsAb para convertir pro-fármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAb que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA); BsAb para abordar complejos inmunes con receptores de superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor Fc (por ejemplo, FcγRI, o FcγRIII); BsAb para uso en terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (HSV), anti-complejo receptor de células T:CD3/anti-influenza, anti-FcγR/anti-VIH; BsAb para detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAb como adyuvantes de vacuna; y BsAb como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano rústico (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Ejemplos de anticuerpos trispecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

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

Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos de este documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Un "anticuerpo intacto" en este documento es uno que comprende dos regiones de unión a antígeno, y una región Fc. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una región Fc funcional.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno así como aquellos en que tiene que prevenirse el trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo purificado como se describe en este documento. Esto incluye trastorno y enfermedades tanto crónicas como agudas y aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

La palabra "marcador" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. El marcador puede ser en sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopo o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, I⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Modos para realizar la invención

La invención de este documento proporciona métodos para purificar un anticuerpo de una composición (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes. La composición es generalmente

una resultante de la producción recombinante del anticuerpo, pero puede ser la resultante de producción del anticuerpo por síntesis de péptidos (u otro medio sintético) o el anticuerpo puede purificarse de una fuente nativa del anticuerpo. Preferiblemente el anticuerpo se une al antígeno CD20 humano, tal como rituximab, o se une al antígeno VEGF humano, tal como bevacizumab.

5

Producción recombinante de anticuerpos

Para la producción recombinante del anticuerpo, se aísla el ácido nucleico que lo codifica y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia 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, como se describe en la patente de Estados Unidos 5.534.615).

10

15

Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de este documento son las células procariotas, de levaduras, o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o 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 descrito 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 en lugar de limitantes.

20

25

Además de los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadería, es la más habitualmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están habitualmente disponibles otros varios géneros, especies, y cepas y son útiles en este documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (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, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

30

35

Se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles al público diversas cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus de este documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco como hospedadores.

40

45

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células hospedadora útiles de mamífero incluyen, pero sin limitación, células de riñón de mono CV1 transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células renales embrionarias humanas (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renales 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 renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); 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). A menudo, se prefieren células CHO para la expresión de anticuerpos, y pueden usarse ventajosamente para producir los anticuerpos purificados de acuerdo con la presente invención.

50

55

60

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

65

Las células hospedadoras usadas para producir anticuerpos pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados medios disponibles en el mercado tales como medio de Ham F10 (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) 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 Estados Unidos N^o 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 patente de Estados Unidos Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según lo necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como garamicina; GENTAMYCIN®), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serán conocidas para los especialistas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los especialistas en la técnica.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, los desechos particulados, las células hospedadoras o las células lisadas (por ejemplo, resultantes de la homogenización), se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultra-filtración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadante de dichos sistemas de expresión pueden concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

El método de la invención de cromatografía de intercambio catiónico

En la realización preferida de la invención, la composición a someter al método de purificación de este documento es un anticuerpo producido de forma recombinante, preferiblemente, un anticuerpo intacto, expresado por un cultivo de células hospedadoras recombinantes de ovario de hámster chino (CHO). Opcionalmente, la composición se ha sometido a al menos una etapa de purificación antes de cromatografía de intercambio catiónico. La composición contiene el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes, tales como proteínas de ovario de hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente de medio de cultivo celular (por ejemplo, geramicina; GENTAMICINA®), etc.

Ejemplos de procedimientos adicionales de purificación que pueden realizarse antes de, durante, o después del método de cromatografía de intercambio catiónico incluyen fraccionamiento en una cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, en FENIL-SEPHAROSE™), precipitación en etanol, enfoque isoeléctrico, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en HEPARINA SEPHAROSE™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía adicional de intercambio catiónico, intercambio de iones en modo mixto, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía por inducción de carga hidrófoba, y cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A, proteína G, un anticuerpo, o un sustrato específico, ligando o antígeno como reactivo de captura).

De acuerdo con la presente invención, el esquema de purificación de intercambio catiónico normalmente incluye las siguientes etapas realizadas secuencialmente: (1) equilibrado del material de intercambio catiónico; (2) carga de la composición a purificar en el material de intercambio catiónico, (3) una primera etapa de lavado; (4) una segunda etapa de lavado, y (5) elución del anticuerpo de interés.

Incluyendo al menos dos etapas de lavado en el esquema de purificación por intercambio catiónico, realizándose al menos la primera de ellas a elevado pH (aproximadamente pH 6,8 o mayor), puede mejorarse significativamente la eficacia de purificación. En particular, realizando la primera etapa de lavado usando un tampón de lavado con un pH en el intervalo de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 9,0 (por ejemplo, de aproximadamente 7,0 a 8,0), tal como, por ejemplo, aproximadamente pH 7,8 o aproximadamente pH 7,0, se retiran los contaminantes descritos de forma más eficaz que usando el intervalo convencional de pH más bajo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5. Como resultado, el contenido de proteínas celulares hospedadoras de la composición que comprende el anticuerpo eluido del material de intercambio catiónico es normalmente menor de aproximadamente 200 ppm, que está por debajo del nivel de aproximadamente 500 ppm conseguido usando una etapa de lavado a un pH de aproximadamente 5 a 5,5.

En la realización preferida de la invención, el material de intercambio catiónico comprende partículas de flujo continuo (fase sólida) de poli(estireno-divinilbenzeno) reticulado recubiertas con un polímero polihidroxilado funcionalizado con grupos sulfopropilo, por ejemplo, una columna POROS 50 HS® disponible en Applied Biosystems.

Habitualmente, se pasa un tampón de equilibrado sobre o a través del material de intercambio catiónico antes de cargar la composición que comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes en el material. En la

realización preferida de la invención, el tampón de equilibrado tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, por ejemplo aproximadamente pH 5,5. Un tampón de equilibrado ejemplar comprende MES 19 mM, NaCl 60 mM, pH 5,50. Otro tampón de equilibrado ejemplar comprende MES 23 mM, NaCl 60 mM, pH 5,50.

5 Después del equilibrado, se carga una solución acuosa que comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes en el material de intercambio catiónico. El pH de la carga está en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, por ejemplo aproximadamente pH 5,0 o aproximadamente pH 5,5. En una realización preferida, se carga una combinación de productos condicionados de una etapa previa de purificación. En una
10 realización, se carga una combinación de proteína A de una purificación previa por cromatografía con proteína A, pH 5,0 en el material de intercambio catiónico. En otra realización, se carga una combinación condicionada de Q-SEPHAROSE®, pH 5,0 en el material de intercambio catiónico. Las densidades de carga ejemplares están en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 g/l de resina, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 g/l de resina, mucho más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 g/l de resina. El anticuerpo de interés se une al material de intercambio catiónico como resultado de esta etapa de
15 carga.

Después de la carga, el material de intercambio catiónico se lava en una primera etapa de lavado con un primer tampón de lavado. Durante el proceso de lavado, el tampón de lavado se pasa sobre el material de intercambio catiónico. La composición del tampón de lavado se elige normalmente para eluir la mayor cantidad de contaminantes
20 posible de la resina sin eluir una cantidad sustancial del anticuerpo de interés. El pH del primer tampón de lavado es generalmente superior al del tampón de equilibrado y/o de la composición cargada, por ejemplo aproximadamente 2 a aproximadamente 3 unidades de pH superior. Preferiblemente, el pH del primer tampón de lavado está en el intervalo de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente 8,0, por ejemplo aproximadamente pH 7,8 o aproximadamente pH 7,0. Ejemplos de tampones
25 que tamponan en este intervalo de pH incluyen, aunque sin limitación, HEPES, MES, acetato sódico, TRIS/HCl, clorhidrato de trietanolamina/NaOH, Bicina/HCl, Tricina/HCl, etc. El primer tampón de lavado preferido comprende o consiste en: (1) HEPES 25 mM, pH 7,8 o (2) MOPS 25 mM, pH 7,0.

A este respecto, la presente descripción proporciona una composición que comprende un anticuerpo químico recombinante contra CD20, tal como rituximab, en HEPES 25 mM, pH 7,0. La descripción también proporciona un anticuerpo humanizado recombinante contra VEGF, tal como bevacizumab, en MOPS 25 mM, pH 7,0. Dichas composiciones son útiles, entre otras cosas, como composiciones intermedias usadas en la purificación de estos
30 productos.

La invención de este documento generalmente implica al menos una etapa adicional, o segunda de lavado usando un segundo tampón de lavado. El pH del segundo tampón de lavado preferiblemente es inferior al del primer tampón de lavado, por ejemplo de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 unidades de pH inferior. Por tanto, por ejemplo, el pH del segundo tampón de lavado puede estar en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Preferiblemente, el pH del segundo tampón de lavado es aproximadamente 5,5. Ejemplos de tampones que
40 tamponan en este intervalo de pH incluyen, aunque sin limitación, MES, ácido acético/acetato sódico o NaOH, $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, Bis.Tris/HCl. MES, pH 5,5 es el tampón preferido para el segundo lavado. En una realización, el segundo tampón de lavado comprende o consiste en: MES 19 mM, NaCl 10 mM, pH 5,50. En otra realización, el segundo tampón de lavado comprende o consiste en MES 23 mM, NaCl 10 mM, pH 5,50.

45 Aunque pueden emplearse etapas adicionales de lavado, preferiblemente se realiza solamente una primera y segunda etapa de lavado, antes de eluir el anticuerpo deseado. Los contaminantes tales como los analizados anteriormente se retiran del material de intercambio catiónico durante la primera y/o segunda etapa de lavado. Preferiblemente, la primera etapa de lavado retira la mayoría de los contaminantes.

Después de la etapa o etapas de lavado indicadas anteriormente, el anticuerpo deseado se eluye del material de intercambio catiónico. La elución del anticuerpo puede conseguirse aumentando la conductividad o fuerza iónica. De forma deseable, la conductividad del tampón de elución es mayor de aproximadamente 10 mS/cm. La conductividad aumentada puede conseguirse incluyendo una concentración salina relativamente elevada en el tampón de elución. Las sales ejemplares para este propósito incluyen, sin limitación, acetato sódico, cloruro sódico (NaCl), y cloruro potásico (KCl). En una realización, el tampón de elución comprende NaCl de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mM. El tampón de elución generalmente tendrá aproximadamente el mismo pH que el
55 segundo tampón de lavado. Un tampón de elución preferido comprende: MES 19 mM, NaCl 160 mM, pH 5,5. Otro tampón de elución preferido comprende: MES 23 mM, NaCl 175 mM, pH 5,5. La elución preferiblemente implica elución por etapas (en oposición a elución en gradiente).

60 Aunque la etapa de elución viene seguida opcionalmente por una etapa de regeneración, ésta no es necesaria de acuerdo con la realización preferida de la invención.

Aunque se contemplan etapas adicionales, preferiblemente el método de purificación de intercambio catiónico de este documento consiste en solamente las siguientes etapas: equilibrado (por ejemplo, usando tampón de equilibrado pH aproximadamente 5,5), carga de una composición que comprende el anticuerpo y contaminante o
65

contaminantes (por ejemplo, donde el pH de la composición cargada es aproximadamente 5,0 o aproximadamente 5,5), primera etapa de lavado para eluir los contaminantes (por ejemplo, usando un primer tampón de lavado pH aproximadamente 7,8 o un primer tampón de lavado pH aproximadamente 7,0), segunda etapa de lavado (por ejemplo, usando un segundo tampón de lavado pH aproximadamente 5,0), y elución (por ejemplo, usando tampón de elución pH aproximadamente 5,5, y conductividad aumentada respecto a cada una de las etapas anteriores para eluir el anticuerpo).

La preparación de anticuerpo obtenida de acuerdo con el método de cromatografía de intercambio catiónico de este documento puede someterse a etapas adicionales de purificación, si fuera necesario. Se han analizado anteriormente etapas adicionales ejemplares de purificación.

Opcionalmente, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas heterólogas según se desee. La molécula heteróloga puede, por ejemplo, ser una que aumente la semivida en suero del anticuerpo (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 isotopo radiactivo, etc.).

Una formulación terapéutica que comprende el anticuerpo, opcionalmente conjugado con una molécula heteróloga, puede prepararse mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalkonio, cloruro benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albumina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microsferas de albumina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

La formulación a usar para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas estériles de filtración.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

El anticuerpo purificado como se describe en este documento o la composición que comprende el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable después se usa para diversos usos de diagnóstico, terapéuticos u otros usos conocidos para dichos anticuerpos y composiciones. Por ejemplo, el anticuerpo puede usarse para tratar un trastorno en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo al mamífero. En el caso de un anticuerpo contra CD20 tal como rituximab, puede usarse para agotar las células B, tratar linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, NHL), o leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, CLL) así como enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), lupus, etc. Para un anticuerpo que se une a VEGF, tal como bevacizumab, puede usarse para inhibir la angiogénesis, tratar el cáncer, y tratar la degeneración macular, etc.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Purificación de un anticuerpo contra CD20

Este ejemplo describe un proceso mejorado de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un anticuerpo contra CD20, rituximab. Rituximab se usa para terapia de NHL, CLL, RA, MS, etc. La estructura de la molécula de Rituximab se describe en el documento 5.736.137, Anderson *et al.*, así como en las Fig. 1A-1B de este documento. Rituximab está disponible en el mercado en Genentech, Inc.

Se usa cromatografía de intercambio catiónico para reducir adicionalmente los niveles de CHOP, ADN, proteína A lixiviada, gamicina (GENTAMYCIN®), agregados de Rituximab, y virus potenciales. Rituximab se une a la columna en las condiciones de carga. La columna después se lava, eluye, regenera/desinfecta, y almacena hasta el siguiente uso. Pueden usarse múltiples ciclos para procesar un lote completo de combinación de afinidad. La combinación de intercambio catiónico puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 30 °C durante hasta 3 días o a 5 °C durante hasta 7 días.

La resina de intercambio catiónico (POROS 50 HS®, Applied Biosystems) se compacta en una columna hasta una altura de lecho de 17-33 cm. Antes de cargar la combinación de afinidad, se purga la columna de intercambio catiónico de solución de almacenamiento con tampón de equilibrado. Después del equilibrado, la combinación de afinidad se carga en la columna. El producto se une a la columna en estas condiciones. La columna después se lava con tampón de lavado 1, seguido de tampón de lavado 2. Rituximab se eluye de la columna usando un tampón de elución de alta fuerza iónica.

Se proporciona una comparación de las condiciones para el proceso de la presente invención en comparación con el proceso original (control) en la siguiente tabla.

Tabla 1: Comparación de tampones para procesos de cromatografía de intercambio catiónico de Rituximab

Fase	Composición de tampón (proceso original)	Composición de tampón (proceso ejemplificado)
Pre-equilibrado	MES 20 mM, NaCl 500 mM, pH 5,50	Ninguna
Equilibrado	MES 20 mM, NaCl 60 mM, pH 5,50	MES 19 mM, NaCl 60 mM, pH 5,50
Carga	Combinación de proteína A condicionada, pH 5,00, densidad de carga ≤ 50 g/l de resina	Combinación de proteína A condicionada, pH 5,00, densidad de carga ≤ 50 g/l de resina
Lavado 1	MES 20 mM, NaCl 60 mM, pH 5,50	HEPES 25 mM, pH 7,80
Lavado 2	Ninguno	MES 19 mM, NaCl 10 mM, pH 5,50
Elución	MES 20 mM, NaCl 160 mM, pH 5,50	MES 19 mM, NaCl 160 mM, pH 5,50
Regeneración	MES 20 mM, NaCl 500 mM, pH 5,50	Ninguna
Desinfección	NaOH 0,5 N	NaOH 0,5 N
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	NaOH 0,1 N

Los intervalos deseados de pH, conductividad y molaridad para la carga y los tampones en el proceso de rituximab se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 2: Intervalos preferidos de pH, conductividad y molaridad para el proceso de Rituximab

Tampón	Composición de tampón	pH diana	Intervalo preferido de molaridad de tampón	Intervalo preferido de pH de tampón	Intervalo permitido de conductividad para tampones
Equilibrado	MES 19 mM, NaCl 60 mM	5,5	MES 14 - 23mM NaCl 50 - 70 mM	5,0 - 6,0	5,0 - 7,2 mS/cm
Carga	Combinación de Proteína A condicionada	5,0	NA	4,5 - 5,5	2,5 - 5,5 mS/cm
Lavado 1	HEPES 25 mM	7,8	HEPES 15 - 35 mM	7,5 - 8,1	0,5 - 1,5 mS/cm
Lavado 2	MES 19 mM NaCl 10 mM	5,5	MES 14 - 23mM NaCl 5 - 15 mM	5,0 - 6,0	0,6 - 2,2 mS/cm
Elución	MES 19 mM NaCl 160 mM	5,5	MES 14 - 23 mM NaCl 140 - 180 mM	5,3 - 5,7	13,4 - 17,2 mS/cm
Desinfección	NaOH 0,5 N	NA	NA	NA	NA
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	NA	NA	NA	NA

* Valores de conductividad medidos con compensación de temperatura basándose en una temperatura de 20 °C y un valor alfa de 1,77.

El proceso ejemplificado para purificación de Rituximab potenció la robustez de la eliminación de proteínas de la célula hospedadora posibilitando una mayor retirada de proteínas de la célula hospedadora en las fases de lavado, provocando niveles inferiores de proteínas de la célula hospedadora en la combinación de producto (combinación de elución) y facilitando la retirada de las impurezas en la posterior etapa corriente abajo. La Fig. 3 ilustra las ventajas

del presente proceso en términos de retirada de proteínas de la célula hospedadora.

Ejemplo 2: Purificación de un anticuerpo contra VEGF

5 Este ejemplo describe un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un anticuerpo recombinante humanizado contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (rhUMAb VEGF), bevacizumab. La estructura de la molécula de bevacizumab se describe en la patente de Estados Unidos 7.169.901, Presta et al. Véanse también las Fig. 2A-2B de este documento. Bevacizumab está disponible en el mercado en Genentech, Inc.

10 Este ejemplo resume los estudios de desarrollo realizados sobre la etapa de intercambio catiónico para un proceso mejorado de purificación de bevacizumab. Se evaluaron tres resinas de intercambio catiónico en estos estudios: CM SEPHAROSE FAST FLOW®, SP SEPHAROSE FAST FLOW® y POROS 50HS®. Los procesos de purificación por intercambio catiónico usando estas tres resinas se evaluaron con respecto a: rendimiento del proceso (retirada de impurezas, retirada de retrovirus, y rendimiento de la etapa), calidad del producto, robustez del proceso y ajuste del proceso a todos los sitios actuales de fabricación. Basándose en los datos generados en estos estudios, POROS 15 50HS® mostro rendimiento y robustez superiores del proceso y se seleccionó como la resina de intercambio catiónico para el proceso mejorado de purificación.

20 La cromatografía de intercambio catiónico es la etapa final de cromatografía en el proceso de purificación. Sirve para retirar los componentes del medio de cultivo celular (garamicina), impurezas derivadas de la célula hospedadora (CHOP, y ADN) y formas agregadas de bevacizumab. También funciona como etapa de eliminación viral.

25 La columna se hace funcionar en un modo de unión y elución y se realiza a temperatura ambiente. La columna usa una resina de intercambio catiónico (POROS 50HS®). La resina consiste en un soporte de lecho poroso de poliestireno-divinilbenceno acoplado con un grupo funcional cargado negativamente. La columna se retira del almacenamiento lavando con tampón de equilibrado. La combinación filtrada de virus se diluirá con 0,3 volúmenes de agua para inyección (WFI) para cumplir el límite de conductividad de $\leq 5,5$ mS/cm. La combinación filtrada de virus después se carga en la columna equilibrada. El producto se une a la resina. Después de la carga, la columna se lava con un tampón de alto pH para lavar abundantemente el material de carga a través de la columna y retirar las impurezas CHOP. La columna después se lava con un tampón de bajo contenido salino para bajar el pH y preparar la columna para elución. El producto se eluye usando una elución por etapas de tampón de alto contenido salino con un máximo de 7 volúmenes de columna. Después de la elución, la columna y el calzo se desinfectan con solución de desinfección (NaOH 0,5 N) antes de almacenamiento en solución de almacenamiento (NaOH 0,1 N) hasta su siguiente uso.

35 La siguiente tabla proporciona una descripción de las condiciones para el proceso de bevacizumab de la invención de este documento.

Tabla 3 - Proceso de Bevacizumab

Fase	Tampón / Solución	Parámetro del proceso	Caudal (cm/h)
Altura de lecho (cm)	N/A	30	N/A
Equilibrado	MES 23 mM / NaCl 60 mM pH 5,5, cond. 6,9 mS/cm	4 CV	100
Carga	Combinación filtrada de virus condicionada (VF) pH 5,5 $\pm 0,2$, cond. $\leq 5,5$ mS/cm	15 - 45 g bevacizumab / l de resina	100
Lavado 1	MOPS 25 mM, pH 7,0	3 CV	100
Lavado 2	MES 23 mM / NaCl 10 mM pH 5,5, cond. 1,5 mS/cm	3 CV	100
Elución	MES 23 mM / NaCl 175 mM pH 5,5, cond. 18 mS/cm	7 CV	100
	Combinación de partida	DO ₂₈₀ $\geq 0,5$	N/A
	Combinación final	DO ₂₈₀ ≤ 10	N/A
Desinfección	NaOH 0,5 N	3 - 6 CV	50 - 100
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	3 - 6 CV	50 - 100

40 Los intervalos deseados de pH, conductividad y molaridad para la carga y los tampones en el proceso de bevacizumab se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 4: Intervalos preferidos de pH, conductividad y molaridad para el proceso de Bevacizumab

	Tampón diana	Intervalo diana de pH	Intervalo diana de conductividad	Intervalo preferido de molaridad del tampón	Intervalo preferido de pH del tampón
Equil.	MES 23 mM, NaCl 60 mM	5,4 - 5,60	6,1 - 7,7 mS/cm	MES 13 - 33 mM NaCl 50 - 70 mM	5,1 - 5,9

ES 2 533 266 T3

Carga	Combinación VF diluida con agua para inyección (WFI)	5,3 - 5,7	≤ 5,5 mS/cm	≤ 6,5 mS/cm	5,2 - 5,8
Lavado 1	MOPS 25 mM	6,9 - 7,1	0,2 - 1,2 mS/cm	MOPS 15 - 35 mM	6,6 - 7,4
Lavado 2	MES 23 mM NaCl 10 mM	5,4 - 5,6	1,2 - 1,8 mS/cm	MES 13 - 33 mM NaCl 5 - 20 mM	5,1 - 5,9
Elución	MES 23 mM NaCl 175 mM	5,45 - 5,55	17,5 - 18,5 mS/cm	MES 13 - 33 mM NaCl 160 - 190 mM	5,4 - 5,6
Desinfección	NaOH 0,5 N	NA	50 - 60 mS/cm (diluido 1:1)	NaCl 0,5 N	NA
Almacenamiento	NaOH 0,1 N	NA	17 - 27 mS/cm	NaOH 0,1 N	NA

Se descubrió que el presente proceso es superior al proceso original de bevacizumab que usaba un primer tampón de lavado pH 5,5. El nuevo proceso de este documento era capaz de conseguir combinaciones con niveles inferiores de CHOP, consiguió un mayor rendimiento de etapa y fue un proceso global más robusto para ejecutar en fabricación.

5

Listado de secuencias

- 10 <110> GENENTECH, INC. Lebreton, Benedicte Andree O'Connor, Deborah Ann Safta, Aurelia Sharma, Mandakini
- <120> PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO
- 15 <130> P2280R1 WO
- <150> US 60/983.825
- <151> 30-10-2007
- 20 <160> 20
- <210> 1
- <211> 432
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> la secuencia está sintetizada
- 30 <400> 1

ES 2 533 266 T3

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

ES 2 533 266 T3

	170		175		180
Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser			
	185		190		195
Ser Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys Pro			
	200		205		210
Ser Asn Thr Lys	Val Asp Lys Lys Ala	Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	215		220		225
Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
	230		235		240
Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	245		250		255
Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr	Asp Gly Val Glu Val His			
	260		265		270
Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	275		280		285
Arg Val Val Ser	Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu Asn			
	290		295		300
Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	305		310		315
Pro Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	320		325		330
Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
	335		340		345
Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	350		355		360
Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	365		370		375
Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	380		385		390
Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	395		400		405
Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His			
	410		415		420
Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys			
	425		430		

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

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

ES 2 533 266 T3

<400> 2

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

Gly Glu Cys

5

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

15

<400> 3

ES 2 533 266 T3

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

Ala

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

10

<400> 4

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

Lys

ES 2 533 266 T3

5
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 5

10
Ser Tyr Asn Met His
5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

20
<400> 6

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

25
<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 7

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
5 10

35

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

45
<400> 8

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
5 10

50
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

55

ES 2 533 266 T3

<400> 9

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
5

5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

15

<400> 10

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
5

20

<210> 11
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 11

ES 2 533 266 T3

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

ES 2 533 266 T3

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 350 355 360

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 395 400 405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 410 415 420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 425 430 435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 440 445 450

Pro Gly Lys

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 12

5

10

ES 2 533 266 T3

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

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 13

5

10

ES 2 533 266 T3

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

5 <210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 14

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

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
5

5 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

5

15 Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC. Lebreton, Benedicte Andree O'Connor, Deborah Ann Safta, Aurelia Sharma, Mandakini

20 <120> PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

<130> P2280R1 WO

25 <150> US 60/983.825
<151> 30-10-2007

<160> 20

30 <210> 1
<211> 432
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 1

ES 2 533 266 T3

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

ES 2 533 266 T3

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Asp Gly Val Glu Val His
 260 265 270

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 275 280 285

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 290 295 300

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 305 310 315

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 320 325 330

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 335 340 345

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 350 355 360

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 365 370 375

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 380 385 390

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 395 400 405

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 410 415 420

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 425 430

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

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 2

5

10

ES 2 533 266 T3

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
 35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 3

5

10

ES 2 533 266 T3

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

Ala

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 4

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

Lys

<210> 5

ES 2 533 266 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 5

Ser Tyr Asn Met His

10

5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

20

<400> 6

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

30

<400> 7

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 5 10

35

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 8

45

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

55

<400> 9

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
5

5 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 10

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
5

15 <210> 11
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

25 <400> 11

ES 2 533 266 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 125 130 135
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 140 145 150
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 155 160 165
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175 180
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 185 190 195
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 200 205 210
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 215 220 225
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 350 355 360

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 395 400 405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 410 415 420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 425 430 435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 440 445 450

Pro Gly Lys

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

10

<400> 12

ES 2 533 266 T3

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

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 13

5

10

ES 2 533 266 T3

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

5 <210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 14

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

15 <210> 15
 <211> 10

ES 2 533 266 T3

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
5

5 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
5

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para purificar un anticuerpo de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:
- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un primer pH de 4,0 a 6,0;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado, en donde el pH del primer tampón de lavado es de 6,8 a 9,0;
- 10 (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado de un pH de 5,0 a 6,0; y
(d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico con un tampón de elución a una conductividad que es al menos 2 mS/cm mayor que la del segundo tampón de lavado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el pH del segundo tampón de lavado y el pH del tampón de elución son aproximadamente iguales.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a CD20 humana.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
5. El método de la reivindicación 1, en el que el pH de la composición en (a) es de 4,0 a 6,0, el pH del primer tampón de lavado es de 6,8 a 8,0, el pH del segundo tampón de lavado es de 5,0 a 6,0, y el pH del tampón de elución es de 5,0 a 6,0.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la conductividad del tampón de elución es de 10 mS/cm a 100 mS/cm.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón de elución comprende NaCl 100 a 300 mM.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en el que el material de intercambio catiónico comprende partículas de flujo continuo de poli(estireno-divinilbenceno) reticulado recubiertas con un polímero polihidroxilado funcionalizado con grupos sulfopropilo.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, en el que el contaminante se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN, anticuerpo agregado, componente de medio de cultivo celular, garamicina y contaminante viral.
- 40 10. Un método para purificar un anticuerpo que se une a CD20 humana de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados entre el grupo que consiste en proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN y anticuerpo contra CD20 agregado, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:
- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un pH de 4,0 a 6,0;
- 45 (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado a un pH de 6,8 a 9,0;
- (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado a un pH de 5,0 a 6,0; y
(d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico usando un tampón de elución con un pH de 5,0 a 6,0 y una conductividad de 10 mS/cm a 100 mS/cm.
- 50 11. El método de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo es rituximab.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el tampón de elución comprende NaCl 100 a 300 mM.
- 55 13. Un método para purificar un anticuerpo que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados entre el grupo que consiste en una componente de medio de cultivo celular, garamicina, proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), ADN, contaminante viral y anticuerpo contra VEGF agregado, comprendiendo dicho método las etapas secuenciales de:
- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un pH de 4,0 a 6,0;
- 60 (b) lavar el material de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado a un pH de 6,8 a 8,0;
- (c) lavar el material de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado a un pH de 5,0 a 6,0; y
(d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico usando un tampón de elución con un pH de 5,0 a 6,0 y una conductividad de 10 mS/cm a 100 mS/cm.
- 65

14. El método de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es bevacizumab.
15. El método de la reivindicación 13, en el que el tampón de elución comprende NaCl 100 a 300 mM.

Fig. 1A - Cadena pesada de rituximab

	+1	FR1										10						15	
Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala			
	20						25						30	31	CDR1			35	
36	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	
Trp																			
					40	FR2					45				49	50	52	52A	53
54	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	
Asn																			
	55					60						65	FR3			70			
	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	
Lys																			
	75						80	82	82A	82B	82C	83				85			
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala		
Val																			
	90				94	95	CDR3					100	100A	100B	100C	100D	101	102	103
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp		
Gly																			
	105	FR4				110				113	114						120		
	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
Pro																			

Constante gamma 1 humana

130	133											140						
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
Val																		
					150						154	156	157	162				
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
	169	171											180	182				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
	190											200	203	205				210
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
						220			222	225						230	232	235
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
					240				243	244						250		
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe

ES 2 533 266 T3

260 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

Constante gamma 1 humana - continuación

280 290 292
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

295 296 299 300 310 314 317
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

320 330
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

340 350 355
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

357 360 361 363 370
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

378 381 390
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 Pro

400 402 405 408 410 413 420
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 Thr

428 430 433 440
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 Val

450 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 Ala

470 478 Amino
 ácido # (Kabat)
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys TER

Fig. 2A - Cadena pesada de bevacizumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK
GLEWVGWINTYTGEPTYAADF~~KRRFTF~~SLDTSKSTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVTVSS || ASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSLSPGK

Fig. 2B - Cadena ligera de bevacizumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK
VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYS
TVPWTFGQGTKVEIKR || TVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

FIG. 3 - Retirada de proteínas de la célula hospedadora para procesos de rituximab

