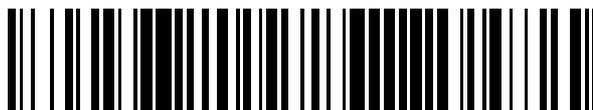


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 067**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2003 E 03756162 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1501369**

54 Título: **Purificación de proteínas basada en la no afinidad**

30 Prioridad:

26.04.2002 US 375953 P

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

08.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FAHNER, ROBERT LEE;
FOLLMAN, DEBORAH;
LEBRETON, BENEDICTE y
VAN REIS, ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 545 067 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 proteínas basada en la no afinidad

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere en general a la purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a un método para la purificación de proteínas (tales como anticuerpos y moléculas similares a anticuerpos, por ejemplo inmunoadhesinas) de una composición que comprende el polipéptido y al menos una impureza sin el uso de cromatografía de afinidad.

Descripción de la técnica relacionada

15 La purificación de proteínas económica a gran escala es un problema cada vez más importante para la industria de la biotecnología. Generalmente, las proteínas se producen mediante cultivo celular, utilizando líneas celulares de mamífero o bacterianas manipuladas para que produzcan la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, deben ser alimentados con un medio de crecimiento complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, por lo general suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células hasta una pureza suficiente para su uso como agente terapéutico humano plantea un desafío formidable.

20 Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de residuos celulares dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Algunas proteínas son secretadas directamente desde la célula en el medio de crecimiento circundante; otras se fabrican intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que se puede hacer mediante diversos métodos, incluyendo cizalla mecánica, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Esta rotura libera el contenido completo de la célula en el homogeneizado y, además, produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se retiran por centrifugación o por filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y la liberación de las proteínas intracelulares de la célula hospedadora en el curso del ciclo de la producción de proteínas.

25 Una vez que se obtiene una solución que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula normalmente se intenta utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan las mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Se dispone de varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, lo que permite un ajuste preciso del esquema de purificación a la proteína concreta implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que se puede hacer que las proteínas se muevan a diferentes velocidades en sentido descendente en una columna larga, lo que consigue una separación física que se incrementa a medida que desciende por columna o a adherirse de forma selectiva al medio de separación, eluyéndose diferencialmente mediante 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 lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo continuo".

30 La cromatografía de intercambio iónico, llamada así por el contraión intercambiable, es un procedimiento aplicable a la purificación de moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas se separan sobre la base de la interacción electrostática no específica de sus grupos cargados con moléculas de carga opuesta unidos a la matriz de soporte en fase sólida, retardando de este modo las moléculas ionizadas que interactúan más fuertemente con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de molécula ionizada, y su afinidad por la matriz, varía según el número de grupos cargados, la carga de cada grupo y la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz en fase sólida cargada. Estas diferencias dan lugar a la resolución de diversos tipos de moléculas mediante cromatografía de intercambio iónico. En la purificación de proteínas típica usando cromatografía de intercambio iónico, una mezcla de muchas proteínas derivadas de una célula hospedadora, tal como en cultivo de células de mamífero, se aplica a una columna de intercambio iónico. Después de las moléculas que no se unen se eliminan mediante lavado, las condiciones se ajustan, tal como cambiando el pH, la concentración de contraiones y similares, en modo de etapas o de gradiente, para liberar de la fase sólida una proteína ionizada de interés retenida no específicamente o retardada de interés y separándola de las proteínas que tienen diferentes características de carga. La cromatografía de intercambio aniónico implica la competición de una molécula aniónica de interés con el contraión negativo por la interacción con una molécula cargada positivamente unida a la matriz en fase sólida al pH y en las condiciones de un proceso de separación particular. Por el contrario, la cromatografía de intercambio catiónico implica la competición de una molécula catiónica de interés con el contraión positivo por la interacción con una molécula cargada negativamente unida a la matriz en fase sólida al pH y en las condiciones de un proceso de separación particular. La cromatografía de intercambio iónico de modo mixto implica el uso de una combinación de

medios cromatográficos de intercambio catiónico y aniónico en la misma etapa. En particular, "de modo mixto" se refiere a una matriz de soporte de fase sólida a la que se une covalentemente una mezcla de intercambio catiónico, de intercambio aniónico y restos de interacción hidrofóbicos. Un representante disponible comercialmente de columnas cromatográficas de intercambio iónico de modo mixto es ABx™, cuyo uso se describe en los Ejemplos.

5 La cromatografía en hidroxiapatita de proteínas implica la interacción inespecífica de los grupos carboxilato o amino cargados de una proteína con grupos de cargas opuestas sobre la hidroxiapatita, en los que la carga neta de la hidroxiapatita y la proteína están controladas por el pH del tampón. La elución se consigue mediante desplazamiento del apareamiento inespecífico de proteína-hidroxiapatita con iones tales como Ca²⁺ o Mg²⁺. Los grupos de proteínas cargadas negativamente son desplazados por los compuestos cargados negativamente, tales como fosfatos, eluyendo de este modo una proteína con carga neta negativa.

15 La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) es útil para la purificación y separación de moléculas, tales como proteínas, basada en diferencias en su hidrofobicidad de la superficie. Los grupos hidrófobos de una proteína interaccionan de forma inespecífica con grupos hidrófobos unidos a la matriz de la cromatografía. Las diferencias en el número y la naturaleza de los grupos hidrófobos de la superficie de la proteína tienen como resultado un retraso diferencial de las proteínas en una columna de CIH y, como resultado, la separación de las proteínas en una mezcla de proteínas.

20 La cromatografía de inducción de carga hidrófoba (CIH) es útil para la separación de moléculas biológicas, tales como proteínas, basado en el comportamiento dependiente del pH de ligandos ionizables, de modo dual (Boschetti, E. et al., Genetic Engineering News 20(13) (2000)). A pH neutro, el ligando está sin carga y se une a una proteína de interés a través de interacción hidrófoba inespecífica leve. Como el pH se reduce durante un gradiente de tampón, el ligando se carga positivamente y la unión hidrófoba se altera mediante repulsión de la carga electrostática (Boschetti, E. (2000), citado anteriormente). Las condiciones suaves utilizadas en la CIH reduce el riesgo de desnaturalización de la proteína y la agregación de anticuerpos.

30 La cromatografía de afinidad, que explota una interacción específica dependiente estructuralmente (es decir, espacialmente complementaria) entre la proteína que se va a purificar y un agente de captura inmovilizado, es una opción de purificación estándar para algunas proteínas, tales como anticuerpos. La proteína A, por ejemplo, es un adsorbente útil para la cromatografía de afinidad de proteínas, tales como anticuerpos, que contienen una región Fc. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kDa de *Staphylococcus aureus* que se une con una afinidad alta (aproximadamente 10⁻⁸M para la IgG humana) a la región Fc de los anticuerpos. A pesar de su uso común, la cromatografía de afinidad es costosa, en particular a la escala industrial necesaria purificar proteínas terapéuticas.

35 La filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR) es una tecnología de membrana útil para la separación de mezclas de proteínas sin limitar su tamaño relativo (Zydney, A.L. y van Reis, R., High-Performance Tangential-Flow Filtration, cap. 10, in Membrane Reparatons in Biotechnology, 2^a ed., William K. Wang, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, NY (2001), pp. 277 - 298; van Reis et al. Journal of Membrane Science 159(1999) 133 - 142, van Reis, R. et al. Biotechnol. Bioeng. 56:71 - 82 (1997); y van Reis, R., U.S. 5.256.694, US 5.256.294, U.S. 5.490.937, y U.S. 6.054.051). La FFTAR se puede usar a lo largo del proceso de purificación aguas abajo para eliminar las impurezas (tales como proteínas, ADN o endotoxinas), eliminar virus y/o eliminar oligómeros proteicos o productos de degradación. La FFTAR es única entre las tecnologías de separación disponibles en cuanto a que puede efectuar de forma simultánea purificación, concentración e intercambio de tampón, lo que permite combinar varias etapas de separación diferentes en una única operación de unidad escalable.

50 A pesar de estos métodos de cromatografía y filtración avanzados, a menudo se usa la cromatografía de afinidad como una etapa de captura para satisfacer los requisitos de pureza, rendimiento y funcionamiento para la purificación de anticuerpos farmacéuticos. Los elevados costes y la inestabilidad de los medios de afinidad, sin embargo, aumentan los costes últimos de las terapéuticas con anticuerpos, particularmente aquellos que requieren dosis altas y/o la administración crónica. Además, a menudo no se logra una pureza adecuada al menos que se combinen varias etapas de purificación, lo que aumenta aún más el coste y reduce el rendimiento del producto. Los anticuerpos representan un porcentaje cada vez mayor de productos terapéuticos en el mercado y en desarrollo en Estados Unidos para el tratamiento de, por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, enfermedad cardiovascular y rechazo del trasplante (Stratan, F. et al., Monoclonal Antibodies - Coming of Age, 1 (2001), y Booth, M. et al., Monoclonal Antibodies: Targeting the Issues, 1 (2001)). En consecuencia, existe una necesidad de procesos que purifiquen proteínas terapéuticas u otros compuestos de polipéptidos utilizando un menor número de etapas y sin la necesidad de una etapa de afinidad costosa.

60 Sumario de la invención

65 La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que un proceso de purificación cromatográfico de no afinidad en combinación con FFTAR es capaz de purificar una proteína diana, tal como un anticuerpo o una molécula similar a anticuerpo, a partir de una mezcla que contiene proteínas de la célula hospedadora de forma que hay impurezas proteicas de la célula hospedadora presentes en la proteína final diana purificada en una cantidad de menos de 100 partes por millón (ppm).

En un aspecto, la invención se refiere a un método para purificar una proteína diana a partir de una mezcla que contiene una proteína de la célula hospedadora y opcionalmente otras impurezas, que comprende dos etapas de purificación de no afinidad seguido filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR), en ausencia de una etapa de cromatografía de afinidad, en la que dicho método produce una proteína diana purificada que contiene

5 menos de 100 partes por millón (ppm) de la proteína de la célula hospedadora, como alternativa menos de 90 ppm, menos de 80ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm, o menos de 3 ppm.

La primera etapa de purificación de no afinidad es la cromatografía de intercambio catiónico y dicha segunda etapa de purificación de no afinidad es la cromatografía de intercambio aniónico. En una realización preferida, el método de la invención consiste en dos etapas de purificación de cromatografía de no afinidad no seguidas de FFTAR y seguidas de una etapa de aislamiento, con exclusión de cualesquiera otras etapas de purificación.

10

La proteína diana a purificar puede ser cualquier proteína, en particular, la proteína recombinante producida en cualquier célula hospedadora, incluyendo, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO). Las proteínas diana óptimas son anticuerpos, inmunoadhesinas y otras moléculas similares a anticuerpos, tales como proteínas de fusión que incluyen una región C_{H2}/C_{H3}.

15

Un experto en la técnica entiende fácilmente estas y otras realizaciones no limitantes de la presente invención tras la lectura de la divulgación y las reivindicaciones proporcionada en el presente documento. Se entiende que esta invención no está limitada a las composiciones particulares de materia y procesos descritos, ya que tales compuestos y métodos pueden, por supuesto, variar. También se entenderá que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir sólo formas de realización concretas.

20

25 Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático de la puesta a punto de la filtración para los experimentos de FFTAR.

La FIGURA 2 muestra gel de poliacrilamida teñido con plata (Zaxis 10 - 20 %), que contiene muestras tomadas a diferentes intervalos durante la purificación del rhuMAb anti-HER2 y se sometieron a análisis SDS-PAGE. Las flechas que indican 160 kDa, 50 kDa y 25 kDa apuntan al anticuerpo de longitud completa, la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. Otras bandas son fragmentos de Rumba anti-HER2. Las muestras incluían un patrón de peso molecular (carril 1), la referencia rhuMAb obtenida mediante un proceso de purificación por afinidad (carriles 2 y 7), una muestra de fluido de cultivo celular con rhuMAb recolectado (FCCR) (carril 3) antes de la purificación y muestras de material recuperado, después de la cromatografía S (carril 4), después de la cromatografía Q (carril 5), después de FFTAR adicional (carriles 6 y 12), después del experimento con FFTAR 1 usando CRC100 + (carril 9), después del experimento con FFTAR 1 usando CRC300 + (carril 10), y después del experimento con FFTAR 2 (carril 11).

30

35

FIGURAS 3A y 3B. La FIGURA 3A es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de rhuMAb anti-HER2; la Figura 3B es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de rhuMAb anti-HER2.

40

FIGURAS 4A y 4B. La FIGURA 4A es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de rhuMAb anti-CD11a; la Figura 4B es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de rhuMAb anti-CD11a.

La FIGURA 5 muestra un gel SDS-PAGE teñido con plata que contiene muestras que se tomaron a diferentes puntos durante la purificación del anticuerpo monoclonal humano recombinante anti-CD40 (rhuMAb).

45

Descripción detallada de las realizaciones

A. Definiciones

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando conserven, o se han modificado para que comprendan, un dominio de unión específico de ligando. El anticuerpo en el presente documento está dirigido contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede resultar un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumor; véase la Patente de Estados Unidos 5 \ 0,091 \ 0,178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos de ejemplo incluyen los polipéptidos tratados anteriormente. Las dianas moleculares preferidas para los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen polipéptidos CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, y CD40; miembros de la familia de receptores HER tales como el receptor EGF, HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Macl, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3, incluyendo las subunidades a o b de los mismos (por ejemplo, los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; polipéptido C etc. Antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas,

50

55

60

65

pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para las moléculas transmembrana, tales como receptores, fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) pueden utilizarse como inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana se pueden utilizar como inmunógeno. Tales células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; diacuerpos; anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria descriptiva, 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 naturales, 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 de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler, y col., (Nature 256:495, 1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante {véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567}. Los "anticuerpos monoclonales" pueden también aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, et al., Nature 352:624 - 628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 - 597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" En los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 - 6855 (1984)).

La expresión "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 2434 (L1), 5056 (L2) y 8997 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 3135 (H1), 5065 (H2) y 95102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 2632 (L1), 5052 (L2) y 9196 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 2632 (H1), 5355 (H2) y 96101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901 - 917 (1987)). "Región Marco" o residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de regiones hipervariables del receptor están sustituidos por residuos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321:522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 - 329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593 - 596 (1992).

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan el "dominio de unión" de una proteína heteróloga "adhesina" (por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con las funciones efectoras de un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las

inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada que distinta del sitio de reconocimiento y unión del antígeno (sitio de combinación del antígeno) de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina deriva preferentemente de las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$, ya que las inmunoadhesinas que comprenden estas regiones pueden purificarse mediante cromatografía de Proteína A (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1 - 13 (1983)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de unión a ligando" se refiere a cualquier receptor de superficie celular nativo o a cualquier región o derivado del mismo que retiene al menos una unión cualitativa al ligando de un receptor nativo correspondiente. En una realización específica, el receptor es de un polipéptido de la superficie celular que tiene un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la superfamilia del gen de la inmunoglobulina. Otros receptores, que no son miembros de la superfamilia del gen de las inmunoglobulinas, pero que, sin embargo, están específicamente cubiertos por esta definición, son los receptores de citocinas, y en particular los receptores con actividad tirosina cinasa (receptores tirosina cinasas), miembros de las superfamilias del receptor de la hematopoyetina y del factor de crecimiento neural, y moléculas de adhesión celular, por ejemplo L- y P-selectinas.

La expresión "dominio de unión al receptor" se utiliza para designar cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que conserva al menos una capacidad cualitativa de unión al receptor de un ligando nativo correspondiente. Esta definición, entre otras, incluye específicamente secuencias de unión de ligandos para los receptores mencionados anteriormente.

Un "quimera anticuerpo-inmunoadhesina" comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal como se define en el presente documento) con al menos una inmunoadhesina (como se define en esta solicitud). Quimeras de anticuerpos inmunoadhesina de ejemplo son las quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas en Berg et al., PNAS (USA) 88:4723 - 4727 (1991) y Chamow et al., J. Immunol. 153:4268 (1994).

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

"Trastuzumab," "HERCEPTIN®," "rhuMAB anti-HER2" y "HER2" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo anti-HER2 humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID N° 2 o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos que conservan la capacidad de unirse a HER2 e inhibir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan HER2. (Figuras 3 A y 3B; véase también la Patente de Estados Unidos 5.677.171).

"rhuMAB Anti-CD11a" o "CD11a" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo anti-CD11a humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID N°: 3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID N°: 4 variantes de las secuencias de aminoácidos de los mismos que conservan la capacidad de unirse a LFA-1 y de inhibir determinadas funciones inmunes dependientes de linfocitos T (Figuras 4A y 4B; véase también la Patente de EE.UU. 5.622.700; WO 98/23761; Steppe et al., Transplant Intl. 4:3 - 7 (1991); y Hourmant et al. Transplantation 58:377 - 380 (1994)). Los anticuerpos anti-CD11a incluyen además, por ejemplo, MHM24 [Hildreth et al., Eur. J. Immunol., 13: 202 - 208 (1983)], R3,1 (IgG1) [R. Rothlein, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT], 25 - 3 (o 25,3), una IgG1 disponible en Immunotech, France [Olive et al., in Feldmann, ed., Human T cell Clones. A new Approach to Immune Regulation, Clifton, NJ, Humana, 1986 p. 173], KBA (IgG2a) [Nishimura et al., Cell. Immunol., 107: 32 (1987); Nishimura et al., ibid., 94: 122 (1985)], M7/15 (IgG2b) [Springer et al., Immunol. Rev., 68: 171 (1982)], IOT16 [Vermot Desroches et al., Scand. J. Immunol., 33: 277 - 286 (1991)], SPVL7 [Vermot Desroches *et al.*, citado anteriormente], y M17 (IgG2a), disponible en la ATCC, que son anticuerpos anti-CD11a murino de rata. Los anticuerpos anti-CD11a preferidos son los anticuerpos humanizados descritos en la patente de EE.UU. 6.037.454. También se prefiere generalmente que los anticuerpos anti-CD11a no sean anticuerpos de depleción de células T, es decir, que la administración del anticuerpo anti-CD11a no reduce el nivel de células T circulantes.

La "composición" que se va a purificar en el presente documento comprende el polipéptido de interés y una o más impurezas. La composición puede estar "parcialmente purificada" (es decir, se ha sometido a una o más etapas de purificación, tal como mediante cromatografía de afinidad descrita en el presente documento o se puede obtener directamente de una célula hospedadora u organismo productor del polipéptido (por ejemplo, la composición puede comprender fluido de cultivo celular recolectado).

Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido es una proteína de mamífero, ejemplos de los cuales incluyen renina; una hormona de crecimiento, incluida la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; el factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante

del tiroides; lipoproteínas; antitripsina alfa-1; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tal como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulación tal como la proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; activador del plasminógeno, tal como urokinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular o de la orina humana (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada con la activación normalmente expresada por linfocitos T y secretada); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora del factor mulieriano; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado con los linfocitos T citotóxicos (CTLA), tales como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o de factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento neural tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tales como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento insulinoide I y -II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimulantes de las colonias (CSF), por ejemplo M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo IL-1 to IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerante del deterioro; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte; receptores domésticos, adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD 11 c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente. Además, una proteína o polipéptido de la invención es un anticuerpo, fragmento o variante del mismo, que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

Una "impureza" es un material que es diferente del producto de polipéptido deseado o proteína de interés. La impureza incluye, pero no se limita a, una proteína de la célula hospedadora (PCH, tal como CHOP), un polipéptido que no sea el polipéptido diana, ácido nucleico, endotoxina, etc.

Una "variante ácida" es una variante de un polipéptido de interés que es más ácida (por ejemplo, como se determina por cromatografía de intercambio catiónico) que el polipéptido de interés. Un ejemplo de una variante ácida es una variante desamidada.

La expresión "proteína de interés" y "proteína diana" se utilizan indistintamente y se refieren a una proteína o polipéptido tal como un anticuerpo (tal como se define en el presente documento) que se va a purificar mediante un método de la invención a partir de una mezcla de proteínas y, opcionalmente, otros materiales tales como restos de células y similares.

Las expresiones "proteína de células de ovario e hámster chino" y "CHOP" se utilizan indistintamente para referirse a una mezcla de proteínas de la célula hospedadora ("PCH") derivado de un cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO"). La PCH o CHOP está generalmente presente como una impureza en un medio de cultivo o lisado celular (por ejemplo, un fluido de cultivo de células cosechadas ("FCCR")) que comprende una proteína de interés tal como un anticuerpo o inmunoadhesina expresada en una célula CHO). La cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una proteína de interés proporciona una medida del grado de pureza para la proteína de interés. PCH o CHOP incluye, pero no se limita a, una proteína de interés expresada por la célula hospedadora, tal como una célula hospedadora CHO. Normalmente, la cantidad de CHOP en una mezcla de proteínas se expresa en partes por millón con respecto a la cantidad de la proteína de interés en la mezcla. Se entiende que cuando la célula hospedadora es otro tipo de células de mamífero, una *E. coli*, una levadura, una célula de insecto, o una célula vegetal, PCH se refiere a las proteínas, distintas a la proteína diana, que se encuentran en un lisado de la célula hospedadora.

La expresión "partes por millón" o "ppm" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una medida de la pureza de la proteína de interés purificada por un método de la invención. Las unidades ppm se refieren a la cantidad de PCH o CHOP en nanogramos/mililitro por proteína de interés en miligramos/mililitro (es decir, ppm de CHOP = (CHOP ng/ml)/(mg/ml de proteína de interés), donde las proteínas están en solución). Cuando las proteínas se secan (tal como por liofilización), ppm se refiere a (ng de CHOP)/(mg de proteína de interés).

Por "purificar" un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y una o más impurezas se entiende aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición eliminando (completa o parcialmente) al menos una impureza de la composición. De acuerdo con la presente invención, la purificación se lleva a cabo sin el uso de una etapa de cromatografía de afinidad. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso de purificación global resultante en una composición "homogénea", que se utiliza en el presente documento para referirse a una composición que comprende menos de 100 ppm de PCH en una composición que comprende la

proteína de interés, de forma alternativa menos de 90 ppm, menos de 80 ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm, o menos de 3 ppm.

- 5 Los términos "proteína A" y "ProA" se utilizan indistintamente en el presente documento y abarca la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida por vías sintéticas (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), y variantes de la misma que retienen la capacidad para unirse a proteínas que tienen una región C_{H2}/C_{H3}, tal como una región Fc. La proteína A se puede adquirir comercialmente de Repligen, Pharmacia y Fermatech. La proteína A es generalmente inmovilizada sobre un material de soporte de fase sólida. El término "ProA" también se refiere a una resina de cromatografía de afinidad o columna que contiene matriz sólida de soporte cromatográfica a la que está unida covalentemente la Proteína A.

- 15 El término "cromatografía" se refiere al proceso mediante el cual un soluto de interés en una mezcla se separa de otros solutos en una mezcla como resultado de diferencias en las velocidades a las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución.

- 20 La expresión "cromatografía de afinidad" y "cromatografía de afinidad de proteínas" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína de interés o anticuerpo de interés se une de forma reversible y específicamente a un ligando bioespecífico. Preferentemente, el ligando bioespecífico está unido covalentemente a un material cromatográfico en fase sólida y es accesible a la proteína de interés en solución cuando la solución entra en contacto con el material en fase sólida cromatográfico. La proteína de interés (por ejemplo, anticuerpo, enzima, proteína receptora) retiene su afinidad de unión específica por el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen de forma apreciable o específica al ligando. La unión de la proteína de interés al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o las impurezas proteicas atraviesen el medio cromatográfico, mientras que la proteína de interés permanece unida específicamente al ligando inmovilizado sobre el material en fase sólida. Después, la proteína de interés unida específicamente se retira en forma activa del ligando inmovilizado con un pH bajo, pH alto, concentración elevada de sal, ligando competidor, y similares, y atraviesa la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de las proteínas contaminantes o de las impurezas de proteínas que antes podían pasar a través de la columna. Se puede usar cualquier componente como un ligando para la purificación de su respectiva proteína de unión específica, por ejemplo anticuerpos.

- 35 Los términos "cromatografía de no afinidad" y "purificación de no afinidad" se refieren a un proceso de purificación en el que no se utiliza cromatografía de afinidad. La cromatografía de no afinidad incluye técnicas cromatográficas que se basan en interacciones no específicas entre una molécula de interés (tal como una proteína, por ejemplo, un anticuerpo) y una matriz en fase sólida.

- 40 La expresión "unión específica", como se usa en el presente documento, tal como para describir las interacciones entre una molécula de interés y un ligando unido a una matriz en fase sólida, generalmente se refiere a la unión reversible de una proteína de interés a un ligando a través de los efectos combinados de la complementariedad espacial de las estructuras de proteínas y el ligando en un sitio de unión junto con las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y/o fuerzas de van der Waals en el sitio de unión. Cuanto mayor es la complementariedad espacial y la más fuerte de las otras fuerzas en el sitio de unión, mayor será la especificidad de unión de una proteína por su respectivo ligando. Ejemplos no limitantes de unión específica incluyen la unión antígeno-anticuerpo, la unión enzima-sustrato, la unión enzima-cofactor, la quelación de iones metálicos, la unión del ADN en proteína-ADN, las interacciones de regulación proteína-proteína y similares no limitantes. Idealmente, en la cromatografía de afinidad, la unión específica se produce con una afinidad de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-8} M en solución libre.

- 55 La expresión "unión no específica", como se usa en el presente documento, tal como para describir las interacciones entre una molécula de interés y un ligando u otro compuesto unido a una matriz en fase sólida, se refiere a la unión de una proteína de interés al ligando o compuesto en una matriz de fase sólida mediante fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y/o fuerzas de van der Waals en un sitio de interacción, pero que carecen de complementariedad estructural que aumenta los efectos de las fuerzas no estructurales. Ejemplos de interacciones no específicas incluyen, pero no se limitan a, fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y de van der Waals, así como puentes de hidrógeno.

- 60 Una "sal" es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Una sal útil para la invención incluye, entre otras, acetato (por ejemplo, acetato sódico), citrato (por ejemplo citrato sódico), cloruro (por ejemplo, cloruro sódico), sulfato (por ejemplo, sulfato sódico), o una sal de potasio.

- 65 Como se usa en el presente documento, "disolvente" se refiere a una sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más de otras sustancias para proporcionar una solución. Los disolventes incluyen disolventes acuosos y orgánicos, de modo que los disolventes orgánicos útiles incluyen un disolvente no polar, etanol, metanol,

isopropanol, acetonitrilo, hexilenglicol, propilenglicol y 2,2-tiodiglicol.

El término "detergente" se refiere a tensioactivos iónicos y no iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo polisorbatos 20 o 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecil sulfato sódico (SDS); Laurilsulfato sódico; octil glucósido sódico; Lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaína; Lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil sódico o metiloleillaurato disódico y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey). Un detergente útil es un polisorbato, tal como polisorbato 20 (TWEEN 20®) o polisorbato 80 (TWEEN 80®).

Un "polímero" en el presente documento es una molécula formada por la unión covalente de dos o más monómeros, en la que los monómeros no son residuos de aminoácidos. Ejemplos de polímeros incluyen polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros (por ejemplo, Pluronic, PF68 etc). Un polímero útil es polietilenglicol (PEG), por ejemplo PEG 400 y PEG 8000.

La expresión "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico" se refiere al proceso cromatográfico en el que un soluto de interés (tal como una proteína) en una mezcla interacciona con un compuesto cargado ligado (tal como por unión covalente) a un material de intercambio iónico en fase sólida tal que el soluto de interés interacciona de forma no específica con el compuesto cargado más o menos que las impurezas o contaminantes del soluto en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla eluyen de una columna de material de intercambio iónico más rápido o más lento que el soluto de interés o se unen o se excluyen de la resina en relación con el soluto de interés. "Cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente intercambio catiónico, intercambio aniónico, y cromatografía de modo mixto.

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

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que uno o más ligandos cargados pueden adherirse. La fase sólida puede ser una columna de purificación, una fase discontinua de partículas pequeñas, 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, cristal de poro controlado), poli(estirenodivinil)benzeno, poli(acrilamida), partículas cerámicas y derivados de cualquiera de los anteriores.

A "resina de intercambio catiónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente y que, por lo tanto, tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa pasada sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede, por ejemplo, ser un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado sobre agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de Pharmacia) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de Pharmacia). A "resina de intercambio iónico de modo mixto" se refiere a una fase sólida que está modificada covalentemente con restos catiónicos, aniónicos e hidrófobos. Una resina de intercambio iónico de modo mixto comercialmente disponible es BAKERBOND ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) que contiene grupos de intercambio catiónico débiles, una concentración baja de grupos de intercambio aniónico y ligandos hidrófobos unidos a una matriz de soporte en fase sólida de gel de sílice.

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

Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por acción de sus componentes de conjugado ácido-base. Varios tampones que se pueden emplear dependiendo de, por ejemplo, el pH deseado del tampón se describen en Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). En una realización, el tampón tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 9, de forma alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de forma alternativa de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, de forma alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. Los ejemplos no limitantes de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen los tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y de amonio, así como combinaciones de estos.

El "tampón de carga" es el que se utiliza para cargar la composición que comprende la molécula polipeptídica de interés y uno o más impurezas sobre la resina de intercambio iónico. El tampón de carga tiene una conductividad y/o pH tal que la molécula polipeptídica de interés (y generalmente una o más impurezas) está unida a la resina de

intercambio iónico o de tal manera que la proteína de interés fluye a través de la columna mientras que las impurezas se unen a la resina.

5 El "tampón intermedio" se utiliza para eluir una o más impurezas de la resina de intercambio iónico, antes de la elución de la molécula polipeptídica de interés. La conductividad y/o el pH del tampón intermedio es/son de forma tal que uno o más impurezas se eluyen de la resina de intercambio iónico, pero no cantidades significativas del polipéptido de interés.

10 La expresión "tampón de lavado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un tampón utilizado para lavar o volver a equilibrar la resina de intercambio iónico, antes de la elución de la molécula polipeptídica de interés. Convenientemente, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser los mismos, pero esto no es necesario.

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

Se puede usar un "tampón de regeneración" para regenerar la resina de intercambio iónico de forma que se pueda reutilizar. El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH como sea necesario para eliminar sustancialmente todas las impurezas y el polipéptido de interés de la resina de intercambio iónico.

20 El término "conductividad" se refiere a la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por el transporte de iones. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medida de conductividad es milliSeimens por centímetro (mS/cm), y se puede medir utilizando un medidor de conductividad vendido, por ejemplo, por Orion. La conductividad de una solución se puede alterar cambiando la
25 concentración de iones en la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tampón y/o la concentración de una sal (por ejemplo, NaCl o KCl) en la solución puede alterarse con el fin de conseguir la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada como en el Ejemplo siguiente.

30 El "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refieren al pH al cual la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI puede calcularse a partir de la carga neta de los residuos de aminoácidos o residuos de ácido siálico de los hidratos de carbono unidos del polipéptido o se puede determinar mediante enfoque isoeléctrico.

35 Por "unión" DE una molécula a un material de intercambio iónico se entiende exponer la molécula al material de intercambio iónico en condiciones apropiadas (pH/conductividad) de tal manera que la molécula se inmovilice de manera reversible dentro o sobre el material de intercambio iónico en virtud de las interacciones iónicas entre la molécula y un grupo cargado o grupos cargados del material de intercambio iónico.

40 Por "lavado" del material de intercambio iónico se entiende pasar un tampón apropiado a través o sobre el material de intercambio iónico.

45 Por "Eluir" una molécula (por ejemplo, polipéptido o impureza) a partir de un material de intercambio iónico se entiende eliminar la molécula del mismo mediante la alteración de la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico de tal manera que el tampón compite con la molécula por los sitios cargados en el material de intercambio iónico.

Como se usa en el presente documento, "filtrado" se refiere a esa porción de una muestra que pasa a través de la membrana de filtración.

50 Como se usa en el presente documento, "fracción retenida" se refiere a esa porción de una muestra que es retenida sustancialmente por la membrana de filtración.

55 "Filtración de flujo tangencial" o "FFT" o "filtración de flujo cruzado" se refiere a un proceso de filtración en el que la mezcla de muestra circula a través de la parte superior de la membrana, mientras que la presión aplicada hace que ciertos solutos y moléculas pequeñas atraviesen la membrana. Normalmente, la solución fluye paralelamente a la membrana del filtro. Un diferencial de presión a través de la membrana provoca que los solutos de fluidos y filtrables fluyan a través del filtro. Esto puede llevarse a cabo como un proceso de flujo continuo, ya que la solución se pasa repetidamente sobre la membrana mientras que el fluido que pasa a través del filtro se extrae de forma continua hacia un circuito separado.

60 "Filtración de flujo tangencial de alto rendimiento" o "FFTAR" se refiere a la FFT realizada a un flujo entre 5 % y 100 % presión transmembrana en la curva del flujo frente a la presión transmembrana (véase, por ejemplo, van Reis, R. patente de EE.UU. N° 5.256.694; patente de EE.UU. N° 4.490.937; y la patente de EE.UU. N° 6.054.051).

65

Como se usa en el presente documento, "impurezas de L lisado" se refiere a todos los componentes no deseados de una mezcla en la que está contenido el ADN plasmídico deseado, incluyendo el ADN cromosómico, proteínas del hospedadora, restos de células, las proteínas secretadas POR la célula hospedadora, incluidos los desechos de la membrana celular, los hidratos DE CARBONO, pequeños nucleótidos degradados, ARN del hospedador, lipopolisacáridos etc.

"Membrana de celulosa" se refiere a un polímero de celulosa, en el que la celulosa está formada por unidades de repetición de D-glucosa. El grupo de alcohol primario de un monómero de glucosa proporciona la especie reactiva sobre la membrana a la que el compuesto cargado se une covalentemente.

"Membrana de CRC" se refiere a una membrana de celulosa regenerada compuesta preparada por moldeo de celulosa sobre un sustrato microporoso para controlar el tamaño medio de poro y limitar el número de defectos en la hoja de celulosa.

"Compuesto cargado" se refiere al compuesto unido a la membrana de filtración, en el que el compuesto comprende un resto que tiene una carga positiva o negativa en las condiciones utilizadas para separar una proteína de una mezcla de proteínas. De acuerdo con la invención, el compuesto cargado puede comprender además un brazo enlazador entre la membrana y el resto cargado de manera que el compuesto cargado se proyecta desde la superficie de la membrana. Cuando el compuesto cargado se proyecta desde la superficie de un poro hacia el interior del lumen del poro, el compuesto cargado modifica el tamaño efectivo del poro y modifica la distribución del tamaño de poro de la membrana.

"Compuesto cargado reactivo" se refiere al compuesto cargado antes de la unión a la membrana, de tal manera que el compuesto cargado reactivo todavía retiene el resto reactivo que estimula la reacción de compuesto cargado reactivo a la membrana. Por ejemplo, donde el compuesto cargado es un ión de trimetilpropilamonio unido covalentemente a una membrana de celulosa, el compuesto cargado reactivo puede ser bromuro de trimetilbromopropilamonio. La unión covalente implica el desplazamiento nucleofílico del bromuro de alquilo por un alcohol primario de la matriz de celulosa.

"Brazo enlazador" se refiere a la porción de la molécula de compuesto cargado entre la parte que reacciona o que ha reaccionado con un grupo reactivo sobre la superficie de una filtración membrana y el resto cargado. Preferentemente, el brazo enlazador es una cadena de átomos o de subunidades moleculares, en la que la cadena es inerte en las condiciones de reacción utilizadas para unir covalentemente el compuesto cargado a la membrana, y es además inerte en las condiciones acuosas utilizadas durante la separación de proteínas. Un brazo enlazador puede comprender, pero no se limita a, una cadena de alquilo de uno a veinte átomos de carbono, una cadena de hidratos de carbono de uno hasta quince restos de sacáridos (incluyendo, por ejemplo, ribosa y desoxirribosa), una cadena dextrano de uno a quince restos de sacárido, una cadena de aminoácidos de uno hasta veinticinco aminoácidos, y otros polímeros (tales como los utilizados para la fabricación de la propia membrana) de una hasta veinticinco unidades repetitivas. Cuando un compuesto cargado comprende una cadena de aminoácidos como brazo enlazador y el resto cargado es el aminoácido terminal de la cadena, la cadena lateral del aminoácido terminal es, preferentemente, una cadena lateral cargada.

"Tamizado" se refiere a la relación de la concentración de un soluto particular en el filtrado (aguas abajo de la membrana) con la concentración del mismo soluto en la solución de alimentación (aguas arriba de la membrana) (véase Zeman y Zydney, citado anteriormente, p. 308). En general, un alto valor de tamizado sugiere que el soluto pasa fácilmente a través de la membrana, mientras que un valor bajo de tamizado sugiere que el soluto queda retenido en gran medida por la membrana. Cuando se desea retener un soluto aguas arriba de la membrana, se prefiere un coeficiente de tamizado reducido.

"Permeabilidad" se refiere a la tasa de filtración dividida por el descenso de la presión neta a través de la membrana. Por lo tanto, la permeabilidad es la inversa de la resistencia de la membrana. La permeabilidad de la membrana está determinada principalmente por la distribución del tamaño de poro, la porosidad (densidad de poros), el espesor de la membrana y la viscosidad del disolvente. Generalmente, a medida que aumenta la permeabilidad, el tamizado aumenta. Cuando tamizado mejora debido a la adición de un compuesto cargado a la membrana, la mejora del tamizado es una mejora relativa a una membrana que tiene sustancialmente la misma permeabilidad que la membrana cargada, pero que carece del compuesto cargado. Por lo tanto, donde la mejora es una reducción en el tamizado debido a que un soluto cargado, tal como una proteína, es retenido por una membrana cargada similar, el tamizado es una reducción una permeabilidad comparable o sustancialmente igual. En consecuencia, se mantiene la tasa de filtración, mientras que la selectividad de la membrana se mejora.

La "distribución de tamaño de poro" se refiere, básicamente, al número de poros que tienen un radio real, R, cerca de algunos radios teóricos, r, expresada como la función de densidad de probabilidad (véase Zeman, L.J. y Zydney, A.L., citado anteriormente, p. 299 - 301). A medida que la desviación estándar de los radios reales de los poros aumenta, la distribución del tamaño de poro aumenta. La distribución del tamaño de poro estrechada es el resultado de una reducción en la desviación estándar de los poros respecto al valor teórico. Esto se consigue, por ejemplo, cuando los tamaños de algunos de los poros más grandes se reducen mediante la adición de compuesto cargado en

los poros más grandes de una membrana cargada. El principio de intrusión de poro líquido-líquido es útil para medir la distribución de tamaño de poro (véase R. van Reis y A.L. Zydney, citado anteriormente, p. 2201). De acuerdo con este principio, dos líquidos altamente inmiscibles, tales como las soluciones de una sal sulfato y un poli(etilenglicol) se ponen en contacto a través de la mezcla para alcanzar el reparto en equilibrio. La membrana a analizar se ceba con uno de los líquidos de manera que todos los poros se llenen. Después de drenar los canales de alimentación, el segundo fluido se introduce en el sistema. Después, el primer fluido es desplazado hacia fuera de los poros por el segundo líquido y el caudal se mide como una función de la presión transmembrana. Los datos resultantes proporcionan información sobre la distribución del tamaño de poro y pueden correlacionarse con el punto de corte nominal del peso molecular (véase R. van Reis y A.L. Zydney, citado anteriormente, p. 2201).

Por "carga neta", cuando se hace referencia a una carga de la membrana o la proteína se entiende una carga que es predominantemente positiva o negativa, pero no se refiere a un valor específico para el número de cargas positivas frente al número de cargas negativas sobre la membrana o proteína, a menos se indique lo contrario. Del mismo modo, "carga similar" y "la misma carga" se refieren a la situación en la que una proteína que tiene una carga dada, positiva o negativa, se compara a una membrana u otra proteína que tiene una carga dada, sea positiva o negativa.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos en los que se va a prevenir el trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el polipéptido purificado tal como se describe en el presente documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El propio marcador puede ser detectable (por ejemplo, marcadores radioisótopos 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.

B. Modos de llevar a cabo la invención

1. Purificación de proteínas

Los fabricantes de productos farmacéuticos basados en proteínas deben cumplir estrictas normas de regulación, incluidos requisitos de pureza extremadamente rigurosos. Para garantizar la seguridad, los organismos reguladores, tales como Food and Drug Administration (FDA), requieren que los productos farmacéuticos basados en proteínas, incluidos los producidos mediante tecnología de ADN recombinante, estén sustancialmente libres de impurezas, tales como proteínas de la célula hospedadora, virus, ADN, endotoxinas, agregados, fragmentos y variantes de la proteína recombinante, y similares. Aunque se dispone de varios protocolos de purificación de proteínas se usan ampliamente en la industria farmacéutica, normalmente incluyen purificación por afinidad, tal como purificación de la proteína A en el caso de anticuerpos, a fin de alcanzar el grado requerido de pureza. Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, aunque la afinidad por la proteína A elimina más del 99,5 % de las impurezas, este beneficio tiene un precio. La proteína A es significativamente más cara que el precio de los medios de no de afinidad y los métodos de purificación basados la proteína A a menudo plantean problemas asociados con la estabilidad de la resina, la facilidad de limpieza y la vida útil, las fugas de ligando y la inmunogenicidad potencial de los residuos de proteína A que contaminan el producto purificado.

La presente invención implica la purificación de proteínas, en particular proteínas recombinantes, por un protocolo que no incluye una etapa de cromatografía de afinidad. Más específicamente, la invención proporciona métodos para la purificación de proteínas (recombinantes), incluyendo, entre otros, anticuerpos, por etapas que no incluyen cromatografía de afinidad, en un grado que permite el uso directo de las proteínas purificadas en la terapia humana, de modo que se eliminan las costosas etapas de la cromatografía de afinidad así como una ultrafiltración diafiltración final con frecuencia requerida para concentrar y formular una proteína terapéutica.

La presente invención se basa en hallazgos experimentales que demuestran que las proteínas recombinantes se pueden purificar a partir de una mezcla que comprende proteínas de la célula hospedadora mediante esquemas de purificación que no emplean la cromatografía de afinidad en la misma medida que procesos que incorporan una etapa de cromatografía de afinidad. En particular, se encontró que un proceso de purificación de no afinidad de tres etapas, incluyendo dos etapas de cromatografía de no afinidad, seguidas de filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR) como última etapa, puede producir un producto de alta pureza que contiene impurezas proteicas de la célula hospedadora en una cantidad de menos de 100 partes por millón (ppm).

La proteína a purificar utilizando el método descrito en el presente documento generalmente se produce utilizando técnicas recombinantes. Los métodos para producir proteínas recombinantes se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 5.534.615 y 4.816.567. En realizaciones preferidas, la proteína de interés se produce en una célula CHO (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11026). Los ejemplos de proteínas que pueden

purificarse utilizando el proceso descrito en el presente documento se han descrito anteriormente.

Al usar las técnicas recombinantes, la proteína se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si la proteína se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración. Cuando la proteína se secreta en el medio, las células hospedadoras recombinantes pueden separarse del medio de cultivo celular mediante filtración de flujo tangencial, por ejemplo.

Una vez que se obtiene una mezcla que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula normalmente se realiza utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan las mezclas de proteínas basándose en su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Se dispone de varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, lo que permite un ajuste preciso del esquema de purificación a la proteína concreta implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que se puede hacer que las proteínas se muevan a diferentes velocidades en sentido descendente en una columna larga, lo que consigue una separación física que se incrementa a medida que desciende por columna o a adherirse de forma selectiva al medio de separación, eluyéndose diferencialmente mediante diferentes tampones. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo continuo".

Como se ha indicado anteriormente, de acuerdo con la presente invención, las proteínas se pueden purificar hasta un grado caracterizado por la presencia de menos de 100 ppm de impurezas proteicas de la célula hospedadora mediante una o dos etapas de purificación de no afinidad, seguido por FFTAR. Las etapas de purificación por no afinidad pueden estar basadas en cromatografía de no afinidad o pueden incluir técnicas de purificación no cromatográficas.

Los ejemplos de etapas de purificación de cromatografía de no afinidad incluyen cromatografía de hidroxapatita; cromatografía de interacción hidrófoba (CIH); HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice; cromatografía de inducción de carga hidrofóbica; cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, SP-Sepharose); cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q-Sepharose), cromatografía de modo mixto (por ejemplo, ABX) y cromatografía de inducción de carga hidrofóbica.

Los ejemplos de etapas de purificación no cromatográficas de no afinidad incluyen diálisis, precipitación en sulfato amónico y precipitación en etanol.

El proceso de la presente invención incluye dos etapas cromatográficas de no afinidad, seguidas de FFTAR, opcionalmente FFTAR de membrana cargada. El protocolo de purificación incluye las etapas de (1) cromatografía de intercambio catiónico, (2) cromatografía de intercambio aniónico y (3) FFTAR en este orden, en ausencia de cualquier etapa de purificación de afinidad, y, preferentemente, sin más etapas de purificación de ningún tipo.

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica cromatográfica que se utiliza habitualmente para la purificación de proteínas. En la cromatografía de intercambio iónico, parches cargados en la superficie del soluto son atraídos por cargas opuestas unidas a una matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución se consigue generalmente mediante el aumento de 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 alterar de este modo la carga del soluto es otra manera de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o escalonado (elución por etapas). En el pasado, estos cambios han sido progresivos, es decir, el pH o la conductividad se incrementan o disminuyen en una sola dirección.

La preparación impura derivada de las células hospedadoras recombinantes se carga en la matriz de cromatografía de fase sólida equilibrada utilizando un tampón de carga que puede ser el mismo que el tampón de equilibrado. Como la preparación impura fluye a través de la fase sólida, la proteína y otras impurezas (tales como las proteínas de ovario de hámster chino, CHOP, cuando la proteína se produce en una célula CHO) se unen de forma diferencial a la fase sólida, de modo que se efectúa la separación a medida que las proteínas pasan a través de la columna de cromatografía.

La cantidad y el tipo de tampón, sal, y/u otro compuesto en la composición del tampón son tales que la cantidad combinada eluye la o las impurezas de proteicas diferencialmente de la proteína de interés, cuando la proteína de interés puede quedar retenida con respecto a las impurezas o las impurezas quedan retenidas con relación a la proteína de interés. Las sales tampón y otros aditivos útiles en la práctica de la invención incluyen, sin limitaciones, sales tampón tales como acetato, citrato, histidina, fosfato, acetato de amonio, MES, CHAPS, MOPSO, Tris, y similares; sales para ajustar la fuerza iónica del tampón, tal como cloruro de sodio y cloruro de potasio; y otros aditivos tales como aminoácidos (tales como glicina e histidina), agentes caotrópicos (tal como urea), alcoholes (tales como etanol, manitol, glicerol, y alcohol bencílico), detergente (tal como Tween™ y C12E8) y azúcares (tal como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa y fructosa). Cualquiera de estos tampones y aditivos y las

concentraciones utilizadas pueden variar según el tipo de cromatografía practicada, las composiciones y concentraciones de dichos tampones y aditivos se determinan fácilmente mediante métodos estándar.

5 El pH del tampón de elución puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 9, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aunque el intervalo de pH o el pH para la elución se determina de acuerdo con la proteína de interés y el tipo de cromatografía y FFTAR practicada. Los intervalos de pH adecuados para una carga, lavado, o tampón de elución se determinan fácilmente mediante métodos estándar tales que la proteína de interés se recupera en una forma activa. Los ejemplos de tampones de elución para este propósito incluyen tampones de citrato o acetato.

15 La fuerza iónica de un tampón (medida como conductividad, por ejemplo) puede ser de aproximadamente 0,2-20 mS/cm, de forma alternativa de aproximadamente 0,2 - 8 mS/cm, de aproximadamente 0,2-6 mS/cm, de aproximadamente 0,2-4 mS/cm, de aproximadamente 0,2-2 mS/cm, o de aproximadamente 1-2 mS/cm, aunque la fuerza iónica o el intervalo de fuerza iónica para una carga, lavado, o tampón de elución se determinarán de acuerdo con la proteína de interés y el tipo de cromatografía practicado y los tampones de diafiltración para el método de FFTAR practicado. Los intervalos de fuerza iónica adecuados para un tampón se determinan fácilmente mediante métodos estándar tales que la proteína de interés se recupera en una forma activa.

20 La etapa de cromatografía de intercambio catiónico normalmente elimina al menos parte de las proteínas de células hospedadoras, por ejemplo, CHOP, si la proteína se produjo en células CHO, y variantes, productos de degradación, y agregados de la proteína a purificar. La etapa de cromatografía de intercambio aniónico purifica adicionalmente la proteína a partir de las proteínas de la célula hospedadora restantes, por ejemplo, CHOP, variantes, productos de degradación y agregados de la proteína, y también de las endotoxinas y las impurezas de ADN.

25 Después de la cromatografía de no afinidad, la proteína eluida de interés se somete a FFTAR. La FFTAR es una operación unitaria bidimensional que separa de forma selectiva los solutos basándose tanto en el tamaño como en la carga. La FFTAR es capaz de proporcionar la alta selectividad requerida para una purificación de proteínas efectiva mediante la explotación de varios desarrollos recientes. En primer lugar, a diferencia de los procesos de membrana tradicionales, la FFTAR se hace funcionar en el régimen dependiente de la presión en condiciones que minimizan el ensuciamiento, evitan la polarización de la concentración, optimizan la separación mediante el mantenimiento de un flujo casi uniforme y presión transmembrana a lo largo del módulo de separación (van Reis, R., Patente de EE.UU. N° 5.256.694; 5.490.937; y 6.054.051, citado anteriormente). La selectividad de la separación se puede mejorar mediante el control de pH del tampón del filtrado y la fuerza iónica para maximizar las diferencias en volumen efectivo de las diferentes especies en una mezcla (van Reis *et al.* (2001), citado anteriormente; van Reis *et al.* (1997), citado anteriormente; y Saksena, S. y Zydney, A.L., *Biotechnol. Bioeng.* 43:960 - 968 (1994)). Además, la carga eléctrica de la membrana se puede modificar para aumentar la exclusión electrostática de todas las especies con carga similares. Por lo tanto, una membrana cargada positivamente rechazará una proteína cargada positivamente en mayor medida que una membrana cargada negativamente de un tamaño de poro similar (van Reis *et al.* (2001), citado anteriormente; Nakao, S. *et al.*, *Desalination* 70:191 - 205 (1988); y van Reis *et al.*, *J. Membr. Sci.* 159:133 - 142 (1999)). Además, las separaciones de proteínas en FFTAR se llevan a cabo usando un modo de diafiltración en el que la impureza (o producto) se elimina de la fracción retenida mediante lavado añadiendo simultáneamente tampón fresco al depósito de alimentación a medida que el filtrado se elimina a través de la membrana. Esta adición de tampón mantiene una concentración de proteína apropiada en la fracción retenida a lo largo de la separación. La diafiltración también hace que sea posible obtener factores de purificación de los productos recogidos en la fracción retenida que son mayores que la selectividad de la membrana debido a la eliminación continua de las impurezas en el filtrado (van Reis *et al.* (2001), citado anteriormente; y van Reis, R. y Saksena, S., *J. Membr. Sci.* 129:19 - 29 (1997)).

50 Una membrana de filtración de FFTAR útil para separaciones de proteínas es una barrera selectiva sintética (frecuentemente polimérica) para ultrafiltración a escala industrial o a escala de laboratorio (UF) (véase Leos J. Zeman y Andrew L. Zydney, "Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications," 1996, Marcel Dekker, Inc., p. 3). En estos procesos, ciertos componentes de la corriente de alimentación, tales como proteínas, pasan a través de poros de la membrana en un filtrado, mientras que otras, por lo general más grandes, proteínas o componentes son retenidos por la membrana en la fracción retenida (véase Zeman y Zydney, citado anteriormente, p. 3).

60 La ultrafiltración de proteínas es un proceso de membrana dirigido por presión utilizado para la concentración o purificación de soluciones de proteínas (Robert van Reis y Andrew L. Zydney, "Protein Ultrafiltration" in *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, M.C. Flickinger y S.W. Drew, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1999), p. 2197). Las membranas de UF normalmente tienen un tamaño de poro medio entre 10 y 500 Angstroms, que está entre el tamaño medio de poro de las membranas de ósmosis inversa y de microfiltración. La ultrafiltración separa solutos basándose en las diferencias en la tasa de filtración de diferentes componentes a través de la membrana en respuesta a una fuerza motriz de presión dada (R. van Reis y A.L. Zydney, citado anteriormente, p. 2197). Las tasas de filtración de solutos y, por lo tanto, la selectividad de la membrana, están determinados por interacciones tanto termodinámicas como hidrodinámicas (R. van Reis y A.L. Zydney, citado

anteriormente, p. 2197). La ultrafiltración se utiliza con frecuencia en el procesamiento aguas abajo para la concentración de proteínas, intercambio de tampón y desalación, purificación de proteínas, aclaramiento de virus y clarificación (R. van Reis y A.L. Zydney, citado anteriormente, p. 2197).

- 5 Usando FFTAR, la proteína deseada se recoge en la fracción retenida o en el filtrado, en función de las tasas de filtración relativas (R. van Reis y A.L. Zydney, citado anteriormente, p. 2197). La FFTAR es útil para separar proteínas de tamaño similar utilizando las membranas semipermeables descritas anteriormente (véase, por ejemplo, R. van Reis, et al., *Biotech. Bioeng.* 56:71 - 82 (1997) y R. van Reis et al., *J. Memb. Sci.* 159:133 - 142 (1999)).
 10 FFTAR consigue una elevada selectividad mediante el control de flujo del filtrado y la mecánica de fluidos del dispositivo con el fin de minimizar el ensuciamiento y explotar los efectos de polarización de la concentración (R. van Reis et al., *J. Memb. Sci.* 159:133 - 142 (1999)).

El rendimiento de la FFTAR puede evaluarse mediante dos parámetros, la selectividad y el rendimiento, que se utilizan para optimizar el rendimiento del proceso y el factor de purificación (van Reis y Saksena, citado anteriormente, 1997; van Reis *et al.*, citado anteriormente, 1999). La selectividad se define como la relación de los coeficientes de tamizado observados de los solutos permeables y retenidos. Dado que la presente aplicación de FFTAR se basa en la retención de una proteína diana y el tamizado de PCH, o las impurezas, la selectividad se describe como:

$$\Psi = \frac{S_{HCP}}{S_{proteína\ diana}} \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que el coeficiente de tamizado se define como la relación adimensional:

$$S = \frac{C_{filtrado}}{C_{Alimentación}} \quad \text{Ecuación 2}$$

25 con $C_{filtrado}$ y $C_{alimentación}$, las concentraciones de soluto en el filtrado y en las líneas de alimentación.

El rendimiento se define como el producto del flujo del filtrado y la diferencia de tamizado entre los solutos permeables y retenidos:

$$J \cdot \Delta S = J \cdot (S_{HCP} - S_{proteína\ diana}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Otro parámetro calculado del proceso es el rendimiento de la fracción retenida durante la diafiltración a volumen constante. Este rendimiento se expresa como:

$$Y = e^{-NS_{proteína\ diana}} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde N es igual al número de diavolumenes y S es igual al tamizado del soluto considerado.

- 40 Otros detalles de las etapas de purificación de la FFTAR se proporcionarán en los ejemplos siguientes.

La medida preferida de la purificación de proteínas mediante el proceso de la presente invención es la medida de la impureza proteica de la célula hospedadora, por ejemplo impureza de CHOP, donde la proteína recombinante que va a purificarse se produce en células CHO. La proteína purificada preferentemente debe contener menos de 100, más preferentemente menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, menos de 5 ppm, o menos de 3 ppm de proteínas de la célula hospedadora, por ejemplo CHOP, cuando los valores de ppm se calculan como se ha definido anteriormente.

La proteína recuperada de este modo puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y se utiliza para diversos usos diagnósticos, terapéuticos u otros conocidos para tales moléculas.

2. Anticuerpos

55 La proteína preferida que se va a purificar según la presente invención es un anticuerpo. En particular, como se describe en los Ejemplos a continuación, para la purificación del anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (RhuMAB), el líquido de cultivo celular recogido acondicionado (FCCR) de las células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan RhuMAB se cargaron en una columna de intercambio catiónico inicial (SP- Sepharose Fast Flow resina, Amersham Biosciences; (S)). El material recogido de la columna de la columna S, el conjunto S, se recogió de la columna de SP-Sepharose, se acondicionó y después se cargó en un intercambio aniónico (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences; (Q)). El material recogido de la columna de intercambio aniónico (tal

como la columna de Q, como cada una en el conjunto Q) se purificó adicionalmente mediante FFTAR.

Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, entre otros: anticuerpos anti-HER2, incluidos Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 - 4289 (1992), la patente de EE.UU. N° 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tal como anti-CD20 quimérico "C2B8" como en la patente de EE.UU. N° 5.736.137 (RITUXAN®), UNA VARIANTE HUMANIZADA O QUIMÉRICA a del anticuerpo 2H7 como en la patente de EE.UU. N° 5.721.108, B1, o Tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993), y la publicación internacional n° No. WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF, incluidos anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados por afinidad huA4,6.1 AVASTIN® (Kim et al., Growth Factors, 7:53 - 64 (1992), publicación de patente internacional n° WO 96/30046, y WO 98/45331, publicada el 15 de octubre de 1998); anticuerpos anti-PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluidos S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (WO00/75348); anti-CD11a (patente de EE.UU. N° 5.622.700, WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3 - 7 (1991), Y Hourmant et al., Transplantation 58:377 - 380 (1994)); anti-IgE (Presta et al., J. Immunol. 151:2623 - 2632 (1993), y publicación internacional N° WO 95/19181); anti-CD18 (patente de EE.UU. N° 5.622.700, presentada el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anti-IgE (incluyendo E25, E26 y E27; patente de EE.UU. N° 5.714.338, presentada el 3 de febrero de 1998 o patente de EE.UU. N° 5.091.313, presentada el 25 de febrero de 1992, el documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o la solicitud internacional n° PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio de 1998, la patente de EE.UU. N° 5.714.338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos anti-TNF- α , incluyendo cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (véase la patente de EE.UU. N° 5.672.347 presentada el 30 de septiembre de 1997, Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646 - 1653 (1996), y Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461 - 1469 (1995)); anti-Tissue Factor (TF) (patente europea n° 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); $\alpha_4\beta_7$ integrina anti-humana (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-EGFR (anticuerpo 225 humanizado o quimerizado como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (patente de EE.UU. N° 4.515.893 presentada el 7 de mayo 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (véase la patente n° 5.693.762 presentada el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4 tal como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52 - 56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann et al. Nature 332:323 - 337 (1988)); anticuerpos anti-receptor de Fc tal como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996 - 5002 (1995); anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tal como hMN-14 (Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl): 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 Supp): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a las células de carcinoma de colon, tales como C242 (Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1 - 9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925 - 937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-VSR tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpos anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo anti-epitopo GD3 idiopático BEC2; anticuerpo anti- $\alpha\beta$ 3 VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humanas tal como ch-G250; ING-1; anticuerpos anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tal como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1). Los antígenos diana preferidos para el anticuerpo en el presente documento son: receptor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a, y CD40.

Aparte de los anticuerpos específicamente identificados anteriormente, el experto en la materia podría generar anticuerpos dirigidos contra un antígeno de interés, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas a continuación.

(a) Selección y preparación de antígenos

El anticuerpo en el presente documento está dirigido contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede resultar un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumor; véase la Patente de Estados Unidos 5 \ 0,091 \ 0,178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Antígenos de ejemplo incluyen las proteínas descritas en la sección (3) a continuación. Los ejemplos de dianas moleculares preferidas para los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40; miembros de la familia de receptores eRbB tales como el receptor del EGF, los receptores HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha\beta$ 3, incluyendo las subunidades α o β de los mismos (por ejemplo, los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C etc, o cualquier otro antígeno

mencionado en el presente documento. Los antígenos a los que los anticuerpos mencionados anteriormente se unen están específicamente incluidos dentro del alcance del presente documento.

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para las moléculas transmembrana, tales como receptores, fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) pueden utilizarse como inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana se pueden utilizar como inmunógeno. Tales células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(b) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales se producen, preferentemente, en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales, se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden hacer en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. También, se usan adecuadamente agentes de agregación, tal como alúmina, para mejorar la respuesta inmunológica.

(c) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al, Nature, 256: 495 (1975), o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. N 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59 - 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin condensar. Por ejemplo, su las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirán hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, mantienen estable el nivel de producción elevado del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU. y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromioma humano-de ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el que células de hibridoma crecen se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos

monoclonales producidos por las células de hibridoma 10 se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

5 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se subclonan mediante procedimientos de dilución límite y se cultivan mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59 - 103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Preferentemente se utiliza el procedimiento de cromatografía de Proteína A descrito en el presente documento.

15 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede introducir en los vectores de expresión que después se transfectan en células hospedadoras tales como *E. coli*, células COS de simio, células de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que, de otro modo, no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes.

20 El DNA también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. N° 4.816.567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia codificadora de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.

30 Normalmente, tales polipéptidos no inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

35 Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552 - 554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624 - 628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 - 597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779 - 783 (1992)), así como la infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265 - 2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

45 (d) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él procedentes una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que normalmente proceden de un dominio variable de "importación": La humanización se puede realizar, esencialmente, 50 siguiendo el método de Winter et al. (Jones et al., *Nature*, 321:522 - 525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534 - 1536 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. 55 En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar la fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigeneicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se somete a detección selectiva contra toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos. Por tanto, la secuencia humana más parecida a la del roedor se acepta como la estructura FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)). Otro método usa una región marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. La misma región marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285

(1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios producidos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizadas. Habitualmente se dispone de modelos tridimensionales de inmunoglobulina y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exhiben probables estructuras conformacionales tridimensionales de candidatos a secuencias de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite en análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias del receptor y de importación, de modo que se consigue el anticuerpo deseado característico, tal como un incremento de afinidad por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, por inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal tiene como resultado la inhibición de producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993, 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 humanos también se pueden obtener a partir de bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 - 597 (1991); Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996)).

(e) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante la 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 mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163 - 167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se puede aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

(e) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque tales moléculas normalmente sólo se unirán a dos antígenos (es decir anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos están abarcados por esta expresión cuando se utiliza en el presente documento.

Los procedimientos de fabricación de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión (Millstein y col. Nature, 305:537 - 539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO 93/08829 y en Trauneker et al., EMBO J., 10:3655 - 3659 (1991).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras

más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

5 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto a dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigirlos a células del sistema inmunológico a células no deseadas (patente de EE.UU. Nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

15 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditioi arsenito sódico para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierten a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

25 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217 - 225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ del anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humano.

30 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido los anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547 - 1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444 - 6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv (sFv) monocatenarios. Véase Gruber y coll., J. Immunol., 152:5368 (1994). Como alternativa, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057 - 1062 (1995). Brevemente, 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 al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

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

3. Inmunoadhesinas

55 El diseño más simple y directo de inmunoadhesina combina el dominio o dominios de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (DEC) de un receptor) con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Habitualmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará en el extremo C con el ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo las fusiones en el extremo N también son posibles.

60 Normalmente, en tales fusiones, el polipéptido quimérico codificado retendrá dominios al menos funcionalmente activos de la bisagra, C_H2 y C_H3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones en el extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N del C_H1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios concretos y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de la adhesina se fusiona en el extremo N del dominio Fc de inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia de la adhesina. Sin embargo, más preferentemente, en la fusión se usa una secuencia que comienza en la región bisagra justo aguas arriba del sitio de escisión de la papaína que define químicamente Fc de IgG (es decir, el resto 216, tomando que el primer resto de la región constante de la cadena pesada es 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de la adhesina se fusiona a (a) la región bisagra y C_{H2} y C_{H3} o (b) los dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3} de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros y, particularmente, como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD, e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; IgM existe generalmente como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero. En el caso de multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

Varias inmunoadhesinas ensambladas de ejemplo dentro del alcance del presente documento se representan esquemáticamente a continuación:

- (a) A_L-A_L;
 (b) A_H-(A_H, A_L-A_H, A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H);
 (c) A_L-A_H-(A_L-A_H, A_L-V_HC_H, V_LC_L-A_H, o V_LC_L-V_HC_H);
 (d) A_L-V_HC_H-(A_H, o A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H);
 (e) V_LC_L-A_H-(A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H); y
 (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina idénticas o diferentes;

V_L es un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero mayor que 1;

Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

En aras de la brevedad, las estructuras anteriores solo muestran las características clave; no indican de unión (U) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando se requieran tales dominios para la actividad de unión, serán construidos para estar presentes en las ubicaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Como alternativa, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre las secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera de inmunoglobulina, de manera tal que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, ya sea entre la bisagra y el dominio C_{H2} o entre los dominios C_{H2} y C_{H3}. Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. 28:1027 - 1037 (1991) han descrito construcciones similares.

Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en las inmunoadhesinas de la presente invención, podría estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina, ya sea asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina, o directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa normalmente con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura similar a una inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidas por puentes disulfuro. Métodos adecuados para la preparación de tales estructuras se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567, expedida el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen más convenientemente mediante la fusión de la secuencia de ADNc que codifica la porción adhesina en el marco a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina también puede utilizarse (véase, por ejemplo, Aruffo et al., Cell 61:1303 - 1313 (1990); y Stamenkovic et al., Cell 66:1133 - 1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. El ADNc que codifica las regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislarse basándose en las secuencias publicadas procedentes de bibliotecas de ADNc derivadas de bazo o de linfocitos de sangre periférica, mediante las técnicas de hibridación o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la expresión eficiente en las células hospedadoras elegidas.

4. Otras proteínas que contienen la región C_{H2}/C_{H3}

En otras realizaciones, la proteína a purificar es una que se fusiona a, o conjugada con, una región C_{H2}/C_{H3}. Tales proteínas de fusión pueden producirse con el fin de aumentar la semivida en suero de la proteína. Ejemplos de proteínas biológicamente importantes que se pueden conjugar de este modo incluyen renina; una hormona de crecimiento, incluida la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; el factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; antitripsina alfa-1; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tal como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulación tal como la proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; activador del plasminógeno, tal como urokinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular o de la orina humana (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (regulada con la activación normalmente expresada por linfocitos T y secretada); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora del factor mulieriano; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado con los linfocitos T citotóxicos (CTLA), tales como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o de factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento neural tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tales como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento insulinoide I y -II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimulantes de las colonias (CSF), por ejemplo M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo IL-1 to IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerante del deterioro; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte; receptores domésticos, adreínas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD 11 c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

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

35 **Ejemplos**

Los ejemplos se facilitan para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención se efectúan y usan, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero tienen algunos errores y desviaciones del experimento.

Para facilitar la lectura, se proporciona una lista de abreviaturas de uso frecuente a través de los ejemplos siguientes:

45 C_f Concentración en el filtrado (g/l)
 C_b Concentración a granel (o concentración de alimentación) (g/l)
 CHO ovario de hámster chino
 CHOP Proteínas de células de ovario de hámster chino
 50 VC Volumen de la columna
 DF Diafiltración
 FCCR Fluido de cultivo celular recolectado
 ICH Cromatografía de inducción de carga hidrofóbica
 PCH Proteína(s) de células hospedadoras
 55 CIH Cromatografía de interacción hidrofóbica
 HPLC Cromatografía de líquidos de alto rendimiento.
 FFTAR Filtración de flujo tangencial de alto rendimiento
 J Flujo del filtrado (l m⁻² h⁻¹)
 Lp Permeabilidad de la membrana
 60 N Número de diavolumenes
 P_{HCP} Factor de purificación basado en la eliminación de PCH
 P_{CHOP} Factor de purificación basado en la eliminación de CHOP
 pI Punto isoeléctrico
 rhuMAb Anticuerpo monoclonal humanizado recombinante
 65 S_i Tamizado de soluto "i"
 Y Rendimiento

ψ Selectividad

Ejemplo 1

5 Dos etapas de purificación de no afinidad

En el presente ejemplo, la purificación de rhuMAb anti-CD11a, se realizó una FFTAR con procesos consistentes en dos etapas de purificación de no afinidad o tres etapas de purificación de no afinidad utilizando diferentes combinaciones de matrices de purificación de no afinidad.

10 El rendimiento de purificación de intercambio catiónico (tal como mediante el uso de una columna de S), de intercambio aniónico (tal como mediante el uso de una columna Q), de intercambio iónico de modo mixto (por ejemplo, mediante el uso de ABX), hidroxiapatita (HA), de interacción hidrofóbica (CIH) y resinas de inducción de carga hidrofóbica (ICH) se examinaron en cada etapa del proceso de purificación cromatográfica para la proteína rhuMAb anti-CD11a. La eliminación de impurezas proteicas de la célula hospedadora (CHOP) y el rendimiento de proteínas se determinó como se describe con detalle en el Ejemplo 2 y en comparación con los procesos tradicionales consistentes en dos o tres etapas y la incorporación de cromatografía de Proteína A (es decir, para procesos de dos etapas, ProA seguido de intercambio aniónico (tal como ProA-Q), y para procesos de tres etapas, ProA seguido de intercambio catiónico, después intercambio aniónico, tal como por ProA-SQ).

20 Resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ (S, resina de intercambio catiónico, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), resina Q-Sepharose Fast Flow™ (Q, resina de intercambio aniónico, Amersham Biosciences, citado anteriormente), resina Bakerbond ABx™ (ABx, resina de intercambio iónico de modo mixto, J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ), resina PHENYL- SEPHAROSE FAST FLOW™ (CIH, resina de interacción hidrofóbica, Amersham Biosciences, citado anteriormente), resina Macroprep Ceramic Hydroxyapatite (HA, resina de hidroxiapatita, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y resina MEP HYPERCEL™ (ICH, resina de inducción de carga hidrofóbica, INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES™, LifeTechnologies, Inc., Rockville, MD) se empaquetaron cada una en columnas de cristal de 0,66 cm ed x 20 cm. Las condiciones de operación para la cromatografía se presentan en la Tabla 1.

30

Tabla 1. Condiciones de funcionamiento de la cromatografía

Resina	Tipo de resina	Modo de operación	Tampones	Acondicionamiento de carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Intercambio aniónico (S)	Unión y elusión inespecíficas	MES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5 10 CV gradiente a NaCl 500 mM	< 5 mS/cm pH 5,5
Bakerbond ABx™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)	Intercambio iónico de modo mixto (ABx)	Unión y elusión inespecíficas	Igual que S	Igual que S
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Intercambio aniónico (Q)	Continuo	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8	< 7 mS/cm pH 8
Phenyl Sepharose Fast Flow™, low sub (Amersham Biosciences, NJ)	Interacción hidrofóbica (CIH)	Unión y elusión inespecíficas	MES 50 mM, Na ₂ SO ₄ 0,8 M pH 6 15 CV gradiente a MES 50 mM, pH 6	Na ₂ SO ₄ 0,8 M pH 6
Macro-Prep hidroxiapatita de cerámica, Tipo II (BioRad, Hercules, CA)	Hidroxiapatita (HA)	Unión y elusión inespecíficas	Fosfato sódico 10 mM pH 6,8 10 CV gradiente a fosfato 400 mM, pH 6,8	< 3 mS/cm pH 6,8
MEP HYPERCEL™ (Life Technologies, Rockville, MD)	Inducción de carga hidrofóbica (ICH)	Unión y elusión inespecíficas	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1 Etapa elusión con acetato 50 mM pH 4	pH > 7

35 Todas las columnas se cargaron hasta 10 mg de anticuerpo por ml de resina a un caudal de 100 cm/h (5 volúmenes de columna por hora).

Entre usos, las resinas de S, ICH y CIH se desinfectaron con ≥ 3 volúmenes de columna de NaOH 0,5 N. Las columnas que contienen resinas ABx, Q y HA se empaquetaron con resina fresca antes de cada uso.

40 Las células CHO que expresan rhuMAb anti-CD11a se cultivaron y se recogió una formulación de cultivo celular recolectado que contiene el anticuerpo. La mezcla de cultivo celular bruta contenía aproximadamente 220.000 ppm de CHOP (equivalente a 220.000 ng DE CHOP/mg de rhuMAb anti-CD11a). Una parte alícuota de la mezcla bruta

se aplicó a cada una de las resinas para la etapa 1 en la Tabla 2. Una parte alícuota del eluato procedente de la Etapa 1 se aplicó después a cada una de las resinas alternativas en la etapa 2 de la Tabla 2, y el anticuerpo y las impurezas se separaron adicionalmente. Las condiciones del tampón para cada etapa se resumen en la Tabla 1. La mezcla bruta y cada conjunto de eluyente de la primera etapa se ajustaron al pH y la fuerza iónica de las condiciones tampón de la resina a la que se aplicó la mezcla bruta o el conjunto de eluato para la siguiente etapa de purificación. Un resumen de los resultados de purificación tal como se mide mediante las concentraciones de CHOP después de cada una de dos etapas de purificación de no afinidad se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Eliminación de CHOP en dos etapas de purificación de no afinidad

Resina usada en la etapa 1	CHOP (ppm; ng/mg de anticuerpo)	Resinas alternativas usadas en la etapa 2	CHOP (ppm; ng/mg de anticuerpo)
Procesos de ensayo:			
Q	23.000	Q	14.000
		CIH	3.000
		ABx	1.000
		S	900
		ICH	11.000
CIH	26.000	Q	9.900
		CIH	2.400
		ABx	400
		S	900
Abx	6.600	Q	3.100
		CIH	2.400
		ABx	1.700
		S	1.000
		ICH	2.800
S	14.000	Q	80
		CIH	600
		ABx	140
		S	2.100
Proceso control:			
ProA	300	S	30

De las etapas de afinidad no examinadas, la columna de la ABx eliminó la mayoría de las impurezas de CHOP de la FCCR, lo que resulta en una concentración de 6600 ppm de CHOP. La pureza de los conjuntos resultantes de dos etapas de la purificación de no afinidad osciló entre 80 ppm y 14.000 ppm de CHOP. La purificación con purificación S como primera etapa de la purificación y Q como la segunda etapa resultó en una baja concentración de CHOP de 80 ppm. Sin embargo, cuando las etapas se invirtieron de manera que la purificación Q fuera la primera etapa y la purificación S fue la segunda etapa; el rendimiento de la purificación fue una concentración de 900 ppm CHOP. El orden de las etapas de los procesos de no afinidad afectó a los resultados de pureza.

La purificación adicional utilizando tres etapas de purificación de no afinidad se evaluó y se comparó con un proceso de purificación de tres etapas que implica una etapa de afinidad de cromatografía de Proteína A, es decir, ProA-SQ, como se muestra en las Tablas 3 y 4. En cuanto a los estudios descritos anteriormente para un proceso de purificación de 2 etapas, partes alícuotas de una mezcla de cultivo celular en bruto que contiene 220.000 ppm de CHOP se ajustaron para el pH y la fuerza iónica de acuerdo con la Tabla 1 para la resina a la que se aplicaron en la etapa 1 de la Tabla 3, y de manera similar para las etapas 2 y 3 de la Tabla 3. Los resultados de eliminación de CHOP utilizando procesos que implican tres etapas de purificación de no afinidad se muestran en la Tabla 3. Los rendimientos de rhuMAb anti-CD11a de algunos de los procesos de purificación DE no afinidad de tres etapas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Eliminación de CHOP en tres etapas de purificación de no afinidad

Resina usada en la etapa 1	[CHOP], ppm, después de la etapa 1	Resina usada en la etapa 2	[CHOP], ppm, después de la etapa 2	Resinas alternativas usadas en la etapa 3	[CHOP], ppm, después de la etapa 3
Procesos de ensayo:					
CIH	26.000	ABx	400	ABx	13
				S	14
				CIH	20
				Q	22

S	14.000	Q	80	ABx S CIH Q	<2 10 <2 30
S	14.000	ABx	140	ABx S CIH Q	28 50 6 <2
Proceso control:					
ProA	730	S	160	Q	<2

Tabla 4. Rendimientos de rhuMAb anti-CD11a más de tres etapas de purificación de no afinidad

Etapas del proceso			Rendimiento global
Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	
Procesos de ensayo:			
S 96 %	Q 100 %	ABx 79 %	76 %
S 96 %	Q 100 %	CIH 89 %	85 %
S 96 %	ABx 92 %	Q 100 %	88 %
Proceso control:			
ProA 97 %	S 89 %	Q 98 %	85 %

- 5 La combinación de dos o más etapas de purificación de no afinidad no resultó en un nivel de pureza, determinado por la eliminación de impurezas de CHOP, de aproximadamente, por ejemplo, 14.000 ppm de CHOP después de la primera etapa de no afinidad, aproximadamente 80 ppm de CHOP después de la segunda etapa de no afinidad y aproximadamente 2 ppm de CHOP después de la tercera etapa del proceso (SQ-ABx o CIH) (véase la Tabla 2), y purezas del producto del anticuerpo anti-CD11a como se muestra en la Tabla 4.

10

Ejemplo 2

Combinación de cromatografía de no afinidad y purificación mediante FFTAR

- 15 El presente ejemplo implica la purificación del anticuerpo monoclonal humano recombinante, rhuMAb anti-HER2, con un peso molecular de 160 kDa y un pI de aproximadamente 9,0 a partir de células de ovario de hámster chino (CHO). El rhuMAb anti-HER2 se obtuvo a partir de un proceso de cultivo de células CHO a escala industrial en Genentech (South San Francisco, CA, EE.UU.). Después de cultivo de células CHO, la molécula de rhuMAb anti-HER2 se clarificó parcialmente mediante centrifugación y filtración normal de las células para eliminar las células y los restos celulares. El conjunto resultante consistía en 0,52 mg/ml del producto rhuMAb anti-HER2 y 0,78 mg/ml de CHOP.

25 Para la purificación de rhuMAb anti-HER2, el líquido de cultivo celular recolectado acondicionado (FCCR) que comprende un producto rhuMAb anti-HER2 y proteínas de la célula hospedadora de ovario de Hámster Chino (CHOP) a partir de células CHO que expresan rhuMAb anti-HER2 se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico inicial (S) (resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences) para eliminar las proteínas de las células hospedadoras o proteínas CHO (CHOP), variantes y agregados. Las eluciones de la columna S se combinaron (conjunto S) y se sometieron a una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico (Q) (resina Q-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para eliminar CHOP y los agregados de la proteína diana. El flujo de la columna Q (conjunto Q) se subdividió y cada conjunto se sometió además a un tercer proceso de FFTAR para la eliminación posterior de CHOP, variantes y moléculas pequeñas. Dos de los conjuntos Q se sometieron a un experimento de FFTAR 1 y experimento de FFTAR 2 como se describe en detalle a continuación.

35 A. Cromatografía de no afinidad

Las columnas de cromatografía se cargaron a aproximadamente 10 gramos de rhuMAb/litro de resina para un total de aproximadamente 40 gramos de rhuMAb a un caudal de 100 cm/h (5 volúmenes de columna (VC) por hora).

40

1. Métodos

Para la preparación de las columnas de cromatografía de no afinidad, la SP-Sepharose de unión y elución y Q-Sepharose de flujo continuo se empaquetaron cada una en columnas a escala preparativa. Las condiciones de operación para cada columna de cromatografía se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de funcionamiento de cromatografía de no afinidad

Resina	Tipo de resina	Modo de operación	Tampones	Acondicionamiento de carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Intercambio catiónico (S)	Unión y elución inespecíficas	MES 25 mM , NaCl 20 mM, pH 5,5 10 CV gradiente a NaCl 500 mM	< 6 mS/cm pH 5,5
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Intercambio aniónico (Q)	Continuo	Tris 25 mM , NaCl 50 mM, pH 8	< 8 mS/cm pH 8

El FCCR se acondicionó mediante la dilución de el FCCR hasta una conductividad de menos de 6 mS/cm con agua y ajustando el FCCR a un pH de 5,5 con HCl y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Un volumen de 66 litros de FCCR acondicionado se sometió a cromatografía de no afinidad.

La columna SP-Sepharose se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) del tampón de la columna (Tabla 5). Los 66 litros del FCCR acondicionado (<10 g/l) se cargaron sobre la columna SP-Sepharose equilibrada. Después de cargar el FCCR acondicionada en la columna de SP-Sepharose, la columna se lavó con 5 VC de tampón de columna. Las eluciones se realizaron con tampón de elución (MES 25 mM, NaCl 500 mM, pH 5,5) con eluyente recogido a una absorbancia de 0,1 a 0,2 AU a 280 nm. La resina de cromatografía se regeneró en una solución 0,5 M de NaOH y se almacenó adicionalmente en NaOH 0,1 M.

Las colecciones de la columna de SP-Sepharose se agruparon (conjunto SP) y se acondicionaron mediante la dilución del conjunto S hasta una conductividad de aproximadamente 7,5 a 8 mS/cm con agua y se ajustaron a un pH de 8 con NaOH. El conjunto S acondicionado se filtró después a través de un filtro de 0,22 µm. El conjunto SP filtrado (aproximadamente 9 litros) se cargó en una columna de Q-Sepharose que se equilibró con 5 VC de tampón de columna (véase la Tabla 5). El flujo continuo se recogió en 0,2 a 0,2 AU a 280 nm y el flujo continuo se agrupó (conjunto Q) Se recogió un total de 20,6 litros del conjunto Q.

La resina de cromatografía Q-Sepharose se regeneró en una solución 0,5 M de NaOH y se almacenó adicionalmente en NaOH 0,1 M. Los 20,6 litros recuperados de la columna Q se dividió en 3 conjuntos idénticos, cada una con un volumen de 6,9 litros y una concentración de aproximadamente 1,4 g/l de rhuMab anti-HER2, antes de la purificación mediante FFTAR.

2. Análisis

La cantidad de rhuMab anti-HER2 en cada conjunto después de una etapa de purificación del proceso, es decir, en el FCCR y en los conjuntos desde el proceso de purificación, se determinó mediante un análisis HPLC basado en Proteína A-Inmunoafinidad. La columna de HPLC fue una Poros Proteína A, 4,6 mm i.d. x 100 mm altura del lecho (PerSeptive Biosystems). Las muestras y los patrones se aplicaron a la columna en un tampón de carga, el analito del rhuMab unido a la columna, se eluyó después en condiciones ácidas. El área del pico del material eluido se comparó con el área del pico de una curva estándar para calcular la cantidad de rhuMab. El intervalo del ensayo era normalmente de 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml.

Tras la finalización de la cromatografía S y Q, las muestras de los conjuntos se sometieron a análisis SDS-PAGE (Figura 2, carriles 4 y 5, respectivamente). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), que separaron las proteínas de acuerdo con el tamaño (respecto al radio hidrodinámico). Las muestras y el patrón del peso molecular (que van de 10 a 200 kDa) se prepararon en condiciones no reductoras y se cargaron en un gel a aproximadamente 2,5 µg/carril. En el presente documento se usó un gel de gradiente de acrilamida al 10 % a 20 %, 8 cm x 8 cm de tamaño (Zaxis International, Inc., Hudson, OH) y se sometió a electroforesis a un voltaje constante de 170 mV. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron para que fueran visibles. A continuación, el gel de electroforesis se trató mediante tinción de plata de acuerdo con el método descrito por Morrissey (Morrissey, J., Analytical Biochemistry, 1981, 117: 307 - 310). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Para determinar la cantidad de rhuMab anti-HER2 presente en cada conjunto como el monómero intacto, las mezclas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (CET) de acuerdo con el siguiente procedimiento. Brevemente, una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) se equilibró en solución salina tamponada con fosfato. Aproximadamente 100 µg de rhuMab por muestra se aplicaron a la columna. La muestra se eluyó de la columna basada en el tamaño molecular de las moléculas de proteína contenidas en la

muestra (intervalo de separación óptimo: 10 a 600 kDa). La absorbancia del eluato de la columna se midió a 280 nm y los picos de elución de las proteínas se integraron para determinar el porcentaje de área de rhuMab monomérico. Los porcentajes del monómero intacto de rhuMab anti-HER2 en el FCCR, el conjunto S, el conjunto Q, y el conjunto FFTAR se muestran en la Tabla 8.

5 La concentración CHOP se determinó mediante ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos anti-cabra (proteína de la célula hospedadora) para cuantificar CHOP. Los anticuerpos enteros de cabra anti-CHOP purificados por afinidad se inmovilizaron sobre pocillos de placas de microtitulación. Las diluciones de las muestras del conjunto, que contienen CHOP, se incubaron en los pocillos, seguido de incubación con peroxidasa conjugada con anti-CHOP enteras. A continuación, la peroxidasa de rábano se cuantificó con o-fenilendiamina mediante la lectura de la absorbancia a 492 nm. Basándose en el principio del ELISA de tipo sándwich, la concentración de la peroxidasa correspondió a la concentración de CHOP. El intervalo del ensayo para el ELISA fue normalmente de 5 ng/ml a 320 ng/ml. Dependiendo de la concentración de las muestras, de 2 a 4 diluciones por muestra se sometieron a ensayo y se realizó un promedio de los resultados corregidos por dilución.

15 B. FFTAR

La filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FFTAR) es una operación de filtración de dos dimensiones que implica la separación de solutos con menos de una diferencia de tamaño DE 10 veces basada en el tamaño y la carga. Como se ha mencionado anteriormente, el conjunto Q se dividió en tres conjuntos Q equivalentes, cada uno con un volumen de 6,9 l y una concentración de aproximadamente 1,4 g/L de rhuMab anti-HER2, antes de la purificación adicional mediante FFTAR. Dos de los conjuntos Q se sometieron al Experimento FFTAR 1, implicando cada uno diferentes condiciones. Tras la determinación de las condiciones óptimas para FFTAR de los estudios del Experimento FFTAR 1, los conjuntos de los experimentos de FFTAR 1 y 2 se sometieron a FFTAR adicional como se describe con detalle a continuación.

1. Membrana

30 Las membranas de filtración utilizadas para FFTAR en estos ejemplos son celulosa regenerada compuesta (CRC)-Millipore ULTRACEL™ (Millipore) con un corte de peso molecular nominal de 300 kDa (PLCMK). Las membranas CRC300 mini-PELLICON2® (Millipore) se modificaron con carga como se describe en el presente documento, lo que tiene como resultado la membrana de celulosa cargada CRC300 + utilizada en los estudios de FFTAR de este Ejemplo. Brevemente, se usó un casete de 300 kDa PELLICON-2® (área de membrana de 0,1 m²) para el experimento escalado descendente (mínimo de 1l de solución). La membrana se limpió de acuerdo con un protocolo de preparación de cartucho antes del primer uso para eliminar cualquier solución de almacenamiento y envío residual y equilibrar la membrana a la condición de tampón adecuada. La membrana se modificó químicamente *in situ* usando bromuro de bromo-propil-trimetil-amonio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en condiciones alcalinas (PCT/US00/19964, cuya totalidad del contenido se incorpora en el presente documento por referencia). Específicamente, la membrana se cargó sin flujo del filtrado co-corriente, al flujo de filtrado constante de 100 lm²h⁻¹, presión de la fracción retenida fijada a 10 psig, reciclado total con el modo abierto del filtrado con 1 l de ligando disuelto en NaOH 0,1 N y 0,2 μm filtrados. La Lp antes de la carga fue de aproximadamente 53 lm²h⁻¹/psi en NaOH 0,1 N, y la Lp después de la carga fue de aproximadamente 37 lm²h⁻¹/psi en 0,1 N de NaOH. Después de la carga, la membrana con carga positiva resultante se limpió utilizando hidróxido sódico 0,1N, se desinfectó con 300 ppm de solución MINNCARE™ y se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N. Antes de cada experimento de FFTAR, la membrana se lavó con el primer tampón de diafiltración del experimento para eliminar la solución de almacenamiento y se ensayó para determinar la integridad. La permeabilidad de la membrana se midió utilizando el sistema de FFTAR con el flujo del filtrado co-corriente en un mínimo de tres flujos de filtrado.

50 2. Sistema de filtración de FFTAR

Los experimentos de FFTAR se realizaron utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial totalmente automatizado con la configuración básica ilustrado en la Figura 1. El sistema de FFTAR incluyó un tanque de reciclaje de acero inoxidable de 40 litros, medidores de alimentación y del flujo del filtrado (Admag Modelo 102 y 105, Johnson Yokogawa Corp., Newman, GA) y transductores de presión (Modelo MSP220-A2, 0-100 psig = 0-7 bares, Anderson Instrumentos, Fultonville, NY). Las bombas de flujo de alimentación y del filtrado co-corriente fueron bombas de desplazamiento positivo (Universal 6, Waukesha Cherry Burrell, Delavan, WI), mientras que las bombas de diafiltración y filtrado eran bombas peristálticas (Modelo L-7518-62, Cole Parmer, Niles, IL). El tanque de reciclado incluyó una sonda de temperatura (Modelo RIX, -29 °C a 82 °C, Moore Industries, Sepulveda, CA). Toda la tubería se construyó en acero inoxidable de 316 l. La válvula de control de presión de la fracción retenida se accionó mediante un diafragma de acero (válvula Model ½ Mikro seal packless control Mikro seal, HD Baumann, Portsmouth, NH), mientras que todas las otras válvulas se accionaron neumáticamente con diafragmas de monómero de propilenoetileno (Biotek Modelo 8836-18-BH, ITT Sherotec, Simi Valley, CA). El nivel de líquido del tanque continuo se midió con una sonda restrictiva magneto (Modelo Tempsonics II, MTS, Research Triangle Park, NC). La adquisición y control de datos se realizaron con el software exclusivo (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) usando una cubierta de software MycroAdvantage (Moore productos, Springhouse, PA).

La FFTAR se llevó a cabo con un caudal de alimentación fijo de 323 l.m⁻².h⁻¹ (caudal de alimentación volumétrico dividido por el área de la membrana) y una presión de la fracción retenida de 100 psi. El caudal del filtrado corriente se controló para alcanzar la presión transmembrana igual a la entrada (alimentación) y la salida (fracción retenida) del casete de membrana. Flujo de filtrado se fijó a 50 l.m⁻².h⁻¹ ajustando la velocidad de la bomba de filtrado. La puesta en marcha de los experimentos de FFTAR incluye una rampa de todos los caudales con el fin de minimizar la diferencia entre la presión transmembrana en la entrada y la salida del casete. La fracción retenida se recicló al tanque de alimentación, mientras que el filtrado se dirigió a un recipiente de recogida. Las muestras de alimentación y filtrado se recolectaron en ambos casos para el producto y el análisis PCH.

10 a. Experimento 1 de FFTAR

Después de la división del conjunto Q, como se ha descrito anteriormente, en los conjuntos Q de 6,9 l, uno de los conjuntos Q se sometió al Experimento 1 de FFTAR usando una membrana CRC300 + en las siguientes condiciones.

15 Las membranas cargadas se equilibraron en el primer tampón de diafiltración primero para este experimento (véase la Tabla 7). El conjunto Q se diluyó para reducir la fuerza iónica y la conductividad del conjunto de rhuMAB a 2,7 mS/cm, se ajustó a un pH de 4,5 y después se añadió al tanque de alimentación (Figura 1). El material en el tanque de alimentación se sometió a concentración por eliminación de una porción de la solución. Cuando el volumen de la masa alcanzó una concentración de la masa (Cb) de 10 g/L, la solución en el tanque de alimentación se sometió a etapas de diafiltración secuenciales. Con una conductividad constante de 1,5 ms/cm, la diafiltración se realizó con 10 diavolumenes a un pH de 4,5 y 5 diavolumenes cada una de pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, y pH 6,5 (Tabla 7). El rendimiento se calcula basándose en el tamizado de productos cuantificables durante la diafiltración usando la siguiente ecuación: $Y = e^{-NST_{proteína\ diana}}$ en el presente documento S es el tamizado de la proteína diana y N el número de diavolumenes.

Tabla 7: Condiciones experimentales y resultados de la etapa de purificación de FFTAR

Conjunto Q	Concentración C _b (g/l)	Diafiltración pH-N	Rendimiento [CHOP] _{final} ppm (%)
Conjunto Q			410
Experimento FFTAR 1		4,5 - 10	
	10	5,0 - 5	
		5,5 - 5	99 %
		6,0 - 5	21
		6,5 - 5	
Experimento FFTAR 2		4,5 - 10	
	10	5,5 - 10	99 %
		6,5 - 10	17
FFTAR adicional (conjuntos combinados de FFTAR 1 y 2)	10	6,5 - 40	99 %
		6,0 - 5	2,2

30 La calidad del producto del conjunto recuperado del experimento de FFTAR 1 se sometió a análisis, incluyendo electroforesis en gel de SDS-PAGE (Figura 2, carriles 10), análisis del % de monómero intacto de rhuMAB y análisis de la concentración de CHOP (Tabla 8), como se ha descrito anteriormente.

El tamizado significativo de CHOP se observó con CRC300 + sin ninguna pérdida significativa de rhuMAB anti-HER2. La concentración final de CHOP en el conjunto recuperado de FFTAR realizado con CRC300 + fue 21 ppm.

35 b. Experimento 2 de FFTAR

Otro de los conjuntos Q, como se ha descrito anteriormente, que tiene 1,4 mg/ml de rhuMAB, 410 ppm de CHOP, un pH de 5,6 y una conductividad de alrededor de 8 mS/cm, se sometió a un experimento de FFTAR 2.

40 Como se ha descrito anteriormente, la membrana CRC300 + se equilibró en el primer tampón de diafiltración para este Experimento 2 de FFTAR (véase la Tabla 7). El conjunto Q se diluyó con agua para reducir la conductividad a 2,4 mS/cm. El pH se ajustó a pH 4,5 con HCl. El conjunto acondicionado resultante se cargó en el tanque de alimentación. En una sola operación, el conjunto se concentró después a 10 g/l a pH 4,5, seguido de una diafiltración a volumen constante de la fracción retenida que comprende una secuencia específica de tampones de diafiltración (Tabla 7). Se seleccionaron tres secuencias de tampones de diafiltración. 10 diavolumenes cada uno a un pH de 4,5, 5,5, y 6,5, a una conductividad constante de 1,5 mS/cm. Todos los experimentos de FFTAR se llevaron a cabo a un flujo de filtrado 50 l.m⁻².h⁻¹ usando un minicasete Pellicon-2® cargado positivamente con una permeabilidad de 36 l.m⁻².h⁻¹/psi.

50 Al finalizar el proceso de FFTAR realizado con CRC300 +, una muestra del conjunto recuperado se sometió a análisis SDS-PAGE (Figura 2, carril 11). La calidad del producto del conjunto recuperado del Experimento 2 de

FFTAR se sometió a análisis adicional, incluyendo la cromatografía de exclusión por tamaño (CET) y análisis de concentración CHOP (Tabla 8).

5 Los factores de purificación para la etapa de FFTAR fue mayor de 24 (es decir, eliminación de CHOP por 24) y la eliminación de CHOP se produjo durante la concentración y la diafiltración. La concentración CHOP se redujo de 410 ppm (concentración en el material recuperado de la columna de cromatografía Q) a 17 ppm (concentración en el material recuperado del Experimento de FFTAR 2) (véase la Tabla 8). No se observaron pérdidas significativas de filtrado.

10 **Tabla 8: Análisis de cuantificación y pureza de las proteínas de la célula hospedadora CHO de la corriente de alimentación de rhuMAb anti-HER2 en los procesos de purificación**

Etapas de purificación	[CHOP] (ppm)	% de monómero rhuMAb intacto (medido mediante CET)
FCCR	1.469,000	--
Conjunto S	144,780	95,9 %
Conjunto Q	410	97,4 %
Experimentos de FFTAR 1, 2	21,17	99,8 %
Proceso control: (usando las etapas: ProA-S-Q-UFDF)	<1	100 %

c. FFTAR adicional

15 El material recuperado después de los experimentos de FFTAR 1 y 2 se combinó y se sometió a más FFTAR adicional del siguiente modo.

20 Como se ha descrito anteriormente, la membrana CRC300 + se equilibró en el primer tampón de diafiltración y el material combinado se cargó en el tanque de alimentación. El material en el tanque de alimentación se sometió a etapas secuenciales óptimas de diafiltración del siguiente modo: 40 diavolumenes a pH 6,5 y 1,5 mS/cm, seguido de 5 diavolumenes a pH 6,0 y 0,3 mS/cm.

25 El proceso de FFTAR adicional reduce la concentración de CHOP en la fracción retenida final a 2,2 ppm. Una muestra del material recuperado después de la adicional se sometió a análisis SDS-PAGE. La calidad del producto del material recuperado después de la FFTAR adicional (Figura 2, carriles 6 y 12) como se determina mediante análisis de SDS-PAGE se comparó con la calidad del producto del material obtenido a través de un proceso de purificación convencional que implica ProA, SP, Q y UFDF (Figura 2, carril 7).

30 El proceso de purificación, que implica dos etapas de purificación de no afinidad y una tercera etapa de FFTAR, dio lugar a un nivel de pureza, determinado por la eliminación de las impurezas de CHOP, de aproximadamente 144.780 ppm de CHOP después de la purificación S, de aproximadamente 410 ppm de CHOP después de la purificación Q, y una pureza final de aproximadamente 17-21 ppm de CHOP. Se consiguió una pureza adicional de aproximadamente 2,2 ppm de CHOP mediante FFTAR adicional, cuya purificación adicional se incorpora alternativamente en la tercera etapa, proporcionando de este modo un proceso de no afinidad de tres pasos comparable a los métodos
35 tradicionales utilizando cromatografía de afinidad costosa.

Ejemplo 3

Combinación de cromatografías de no afinidad y purificación mediante FFTAR

40 El presente ejemplo implica la purificación del anticuerpo monoclonal humano recombinante, rhuMAb anti-CD40, con un peso molecular de 160 kDa y un pI de aproximadamente 9,3 a partir de células de ovario de hámster chino (CHO). El rhuMAb anti-CD40 se obtuvo a partir de un proceso de cultivo de células CHO a escala industrial en Genentech (South San Francisco, CA, EE.UU.). Después de cultivo de células CHO, la molécula de rhuMAb anti-CD40 se clarificó parcialmente mediante centrifugación y filtración normal de las células para eliminar las células y los restos celulares. El conjunto resultante consistía en 1,7 mg/ml del producto rhuMAb anti-CD40 y aproximadamente 0,4 mg/ml de CHOP.

50 Para la purificación de rhuMAb anti-CD40, el líquido de cultivo celular recolectado acondicionado (FCCR) que comprende un producto rhuMAb anti-CD40 y proteínas de la célula hospedadora de ovario de Hámster Chino (CHOP) a partir de células CHO que expresan rhuMAb anti-CD40 se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico inicial (S) (resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences) para eliminar las proteínas de las células hospedadoras o proteínas CHO (CHOP), variantes, impurezas del ADN y agregados. Las eluciones de la columna S se combinaron (conjunto S) y se sometieron a una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico (Q) (resina Q-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para
55 eliminar CHOP, impurezas del ADN y los agregados de la proteína diana. El flujo de la columna Q (conjunto Q) se

sometió además a un tercer proceso de FFTAR para la eliminación posterior de CHOP, variantes y moléculas pequeñas.

A. Cromatografía de no afinidad

5

1. Métodos

Para la preparación de las columnas de cromatografía de no afinidad, la SP-Sepharose de unión y elusión y Q-Sepharose de flujo continuo se empaquetaron cada una en columnas a escala preparativa. Las condiciones de operación para cada columna de cromatografía se presentan en la Tabla 9.

10

Tabla 9. Condiciones de funcionamiento de cromatografía de no afinidad

Resina	Tipo de resina	Modo de operación	Tampones de la columna	Acondicionamiento de carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Intercambio catiónico (S)	Unión y elusión inespecíficas	MES 20 mM, NaAcetato 50 mM, pH 6,5	< 7,0 mS/cm pH 6,5
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Intercambio aniónico (Q)	Continuo	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8	< 8 mS/cm pH 8

El FCCR se acondicionó mediante la dilución de el FCCR hasta una conductividad de menos de 7 mS/cm con agua y ajustando el FCCR a un pH de 6,5 con ácido acético y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. La columna de SP-Sepharose se equilibró con 4 volúmenes de columna (VC) del tampón de la columna (Tabla 9) y se cargó a aproximadamente 30 gramos de rhuMAb/litro de resina para un total de aproximadamente 13 gramos de rhuMAb a un caudal de 150 cm/h. Después de cargar el FCCR acondicionado en la columna de SP-Sepharose, la columna se lavó con 5 VC de tampón de lavado (HEPES 20 mM, acetato sódico 35 mM, pH 8,0), seguido de 3 VC del tampón de la columna (Tabla 9). Las eluciones se realizaron con un gradiente de elución de 10 VC del tampón de la columna al tampón de elución MES 20 mM, acetato sódico 140 mM a pH 6,5, con el eluyente recogido a una absorbancia de 0,1 a 0,5 UA a 280 nm. La resina de cromatografía se regeneró en una solución 0,5 M de NaOH y se almacenó adicionalmente en NaOH 0,1 M.

15

20

Las columna de SP-Sepharose (conjunto SP) se acondicionó mediante la dilución del conjunto S hasta una conductividad de aproximadamente 7,5 mS/cm con agua y se ajustó a un pH de 8 con NaOH. El conjunto S acondicionado, que tiene una masa total de aproximadamente 9 gramos se filtró a continuación a través de un filtro de 0,22 µm. El conjunto SP acondicionado se cargó en una columna de Q-Sepharose que se equilibró con 5 VC de tampón de columna (véase la Tabla 9). El flujo continuo se recogió en 0,2 a 0,2 AU a 280 nm y el flujo continuo se agrupó (conjunto Q) La resina de cromatografía Q-Sepharose se regeneró en una solución 0,5 M de NaOH y se almacenó adicionalmente en NaOH 0,1 M.

25

30

2. Análisis

La cantidad de rhuMAb anti-CD40 en cada conjunto después de una etapa de purificación del proceso, es decir, en el FCCR y en los conjuntos desde el proceso de purificación, se determinó mediante un análisis HPLC basado en Proteína A-Inmunoafinidad como se describe en el ejemplo 2 en el presente documento. La concentración de CHOP se determinó usando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) descrito en Ejemplo 2 del presente documento. Tras la finalización de la cromatografía S y Q, las muestras de los conjuntos se sometieron a análisis SDS-PAGE (Figura 5, carriles 3 y 4, respectivamente). El conjunto Q se diluyó para reducir la fuerza iónica y la conductividad del conjunto de rhuMAb a 1,8 mS/cm, se ajustó a un pH de 4,5 y después se añadió al tanque de reciclado (Figura 1). La etapa de purificación del experimento FFTAR con una membrana CRC300+ cargado positivamente (el experimento HFFTAR) se inició mediante la concentración primero del material del conjunto Q hasta que el volumen de la masa alcanzó una concentración de la masa (C_b) del 10 g/l. A continuación, la solución resultante en el tanque de reciclado se sometió a etapas de diafiltración secuenciales. Con una conductividad constante de 1,5 mS/cm, la diafiltración se realizó con 5 diavolúmenes cada uno a un pH 4,5 y pH 5,5, seguido de 20 diavolúmenes a pH 6,5, seguido de 10 diavolúmenes a pH 7,0 (Tabla 10). El rendimiento se calcula en basándose en el tamizado de productos cuantificables durante la diafiltración usando la siguiente ecuación: $Y = e^{-NST_{\text{proteína diana}}}$ en el presente documento S es el tamizado de la proteína diana y N el número de diavolúmenes.

45

50

Tabla 10: Condiciones experimentales y resultados de la etapa de purificación de FFTAR

	Concentración C _b (g/l)	Diafiltración pH-N	Rendimiento (%)	[CHOP] (ppm)	[ADN] (ppm)
Conjunto Q			96 %	15	15
Conjunto de FFTAR	10	4,5 - 5	99 %	<0,6	<0,6
		5,5 - 5			
		6,5 - 20 7,0 - 10			

La calidad del producto del conjunto recuperado de este experimento de FFTAR se sometió a análisis, incluyendo electroforesis en gel de SDS-PAGE (Figura 2, carril 5), análisis del % de monómero intacto de rhuMAb y análisis de la concentración de CHOP (Tabla 11), como se ha descrito en el ejemplo 2 en el presente documento. La concentración de ADN se evaluó de acuerdo con el ensayo de ADN total THRESHOLD® (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA) (Tabla 11). El ensayo de ADN total THRESHOLD® es específico para ADN de una sola hebra, que se obtiene de la muestra a través de desnaturalización por calor. El ADN monocatenario se marca con proteínas de unión, que están unidos covalentemente a la ureasa y estreptavidina, y forman un complejo de ADN. El complejo de ADN se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa recubierta con biotina conocida como una "barra". La biotina sobre la membrana reacciona con estreptavidina en el complejo de ADN, de modo que captura el complejo. La barra se coloca en el lector de umbral, que contiene el sustrato, urea. La reacción enzimática entre la urea y la ureasa (en el complejo de ADN) cambia el pH local de la solución de sustrato. Un sensor de silicio registra un cambio en el potencial de superficie, que es proporcional al cambio de pH. La tasa de cambio en el potencial de superficie es proporcional a la cantidad de ADN. La cuantificación de las muestras se determina mediante comparación con los patrones de ADN. Las muestras se diluyeron de manera que el contenido de ADN cae dentro del intervalo de notificación de la curva estándar (10 - 400 pg/ml).

Se observó un tamizado significativo de CHOP con una membrana de FFTAR CRC300 +con carga positiva sin ninguna pérdida significativa de rhuMAb anti-CD40 cargado positivamente. La eliminación de CHOP se produjo durante la concentración y la diafiltración. La concentración CHOP se redujo de 15 ppm (concentración en el material recuperado de la columna de cromatografía Q) a menos de 0,6 ppm dentro de los primeros 20 diavolumenes (concentración en el conjunto de proteína en el tanque de reciclado). La eliminación de las impurezas de CHOP se confirmó mediante la medición de la concentración en el material recuperado a partir del experimento de FFTAR (véase la Tabla 11). No se observaron pérdidas significativas de filtrado.

Tabla 11: Análisis de cuantificación y pureza de las proteínas de la célula hospedadora CHO de la corriente de alimentación de rhuMAb anti-CD40 en los procesos de purificación

Etapas de purificación	[CHOP] (ppm)	% de monómero rhuMAb intacto (medido mediante CET)	[ADN] (ppm)
FCCR	240.000	--	>5441
Conjunto S	530	--	0,1
Conjunto Q	15	--	<0,01
Conjunto de FFTAR	<0,6	99,5 %	<0,006
Proceso control: (usando las etapas: ProA-S-Q- UFDf)	3	99,5 %	<0,003

El proceso de purificación, que implica dos etapas de purificación de no afinidad y una tercera etapa de FFTAR, dio lugar a un nivel de pureza, como se determina por (1) la eliminación de impurezas de CHOP, de aproximadamente 530 ppm de CHOP después de la purificación S, de aproximadamente 15 ppm de CHOP después de la purificación Q, y una pureza final de aproximadamente menos de 0,6 ppm de CHOP dentro de 20 diavolumenes, y mediante (2) la eliminación de impurezas de ADN, de aproximadamente 0,1 ppm de CHOP después de la purificación S, de aproximadamente menos de 0,01 ppm de ADN después de la purificación Q, y una pureza final de aproximadamente menos de 0,006 ppm de ADN. Además, el análisis de electroforesis ilustra la pureza comparable del conjunto final de no afinidad (FIGURA 5, carril 5) para que un conjunto convencional obtenido utilizando una etapa de afinidad (FIGURA 5, carril 10).

La Figura 5 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con plata que contiene las muestras que se tomaron en diferentes puntos durante la purificación del anticuerpo monoclonal humano recombinante anti-CD40 (rhuMAb) de acuerdo con el Ejemplo 3 (carriles 2-5) y en comparación con un proceso de purificación convencional que incluye una etapa de purificación de afinidad (carriles 8 -10). Las flechas que indican 160 kDa, 50 kDa y 25 kDa apuntan al anticuerpo de longitud completa, la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. Otras bandas son fragmentos de Rumba anti-CD40. El carril 1 es una mezcla de los patrones de proteína. Los carriles 2-6 son muestras tomadas después de la realización del proceso de no afinidad divulgado en el Ejemplo 3 en el presente documento en el que el fluido de cultivo de la célula hospedadora recolectado (FCCR) (carril 2) se purificó mediante cromatografía de intercambio

5 catiónico (conjunto S, carril 3), seguido de una cromatografía de intercambio aniónico (conjunto Q, carril 4), seguido de FFTAR utilizando una membrana cargada (conjunto de FFTAR, carril 5), seguido de y comparado con el material recuperado después de lavar la membrana de FFTAR y el lado de alimentación del aparato de FFTAR (conjunto del tampón de lavado de FFTAR, carril 6). El carril 7 es el blanco. Los carriles 8-10 corresponden a anti-CD40 en una mezcla de FCCR purificado por un proceso de recuperación convencional que incluye una etapa de cromatografía de afinidad de proteína A (no mostrado), seguido de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (carril 8), seguido de una cromatografía de intercambio aniónico (carril 9), y seguido de una etapa de ultrafiltración (carril 10).

10 Este esquema de purificación proporcionó un proceso de no afinidad de tres etapas comparable a los métodos tradicionales utilizando cromatografía de afinidad costoso.

La memoria descriptiva escrita anterior se considera suficiente para que un experto en la técnica pueda poner en práctica la invención.

15 **Listado de secuencias**

<110> GENENTECH, INC.

<120> PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BASADA EN LA NO AFINIDAD

20 <130> SJK/FP6249767

<140> EP 03756162.8
<141> 25-04-2003

25 <150> PCT/US03/13054
<151> 25-04-2003

30 <150> US 60/375.953
<151> 26-04-2002

<160> 4

35 <210> 1
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> source
<223> /nota = "Descripción de Secuencia artificial: La secuencia es sintetizada"

<400> 1

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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

45 **Arg Phe Ser Gly Ser Arg 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

His Tyr Thr Thr Pro Pro 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> 2
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source

10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia artificial: La secuencia es sintetizada"

<400> 2

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 Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

15

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	440	445	

<210> 3

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

10 <223> /nota = "Descripción de Secuencia artificial: La secuencia es sintetizada"

<400> 3

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	Arg	Ala	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser
				20					25					30
Lys	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	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
His	Asn	Glu	Tyr	Pro	Leu	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> 4
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 545 067 T3

<220>

<221> source

<223> /nota = "Descripción de Secuencia artificial: La secuencia es sintetizada"

5 <400> 4

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	Ser	Phe	Thr
				20					25					30
Gly	His	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Met	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Thr
				95					100					105
Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				110					115					120
Ser	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
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	Val	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	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265					270
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				275					280					285
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				290					295					300
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
				305					310					315
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				320					325					330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				335					340					345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
				350					355					360

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

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

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína diana a partir de una mezcla que contiene una proteína de una célula hospedadora, que comprende someter dicha mezcla a:

- (a) una primera etapa de purificación de no afinidad, y
- (b) una segunda etapa de purificación de no afinidad, seguido de
- (c) filtración de flujo tangencial de alto rendimiento (FTTAR), y
- (d) aislar dicha proteína hasta una pureza que contiene menos de 100 partes por millón (ppm) de dicha proteína de la célula hospedadora,

en el que dicha primera etapa de purificación de no afinidad es la cromatografía de intercambio catiónico y dicha segunda etapa de purificación de no afinidad es cromatografía de intercambio aniónico y en donde el método incluye una etapa de purificación de no afinidad.

2. El método de la reivindicación 1 en el que dicha etapa de cromatografía de intercambio catiónico se realiza en un ligando de intercambio catiónico seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) y sulfonilo.

3. El método de la reivindicación 1 en el que dicha etapa de cromatografía de intercambio catiónico se realiza en una resina de intercambio catiónico seleccionada del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, sulfopropilo inmovilizado en agarosa y sulfonilo inmovilizado en agarosa.

4. El método de la reivindicación 1 en el que dicha etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en un ligando de intercambio aniónico seleccionado del grupo que consiste en DEAE e iones de amonio cuaternario.

5. El método de la reivindicación 1 en el que dicha etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en una resina de intercambio aniónico seleccionada del grupo que consiste en DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y Q SEPHAROSE™.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la FFTAR se realiza utilizando una membrana cargada.

7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína de la célula hospedadora es proteína de ovario de hámster chino (CHOP).

8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína diana es un anticuerpo.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

10. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

11. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

12. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.

13. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, dímeros, anticuerpos lineales, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir fragmentos de anticuerpos.

15. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, CD40, receptor EGF, receptores HER2, HER3 y HER4, LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha v\beta 3$, CD11a, CD18, CD11b, VEGF, IgE, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor *mpl*, CTLA-4 y polipéptido C.

16. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anti-HER2; anti-CD20; anti-IL-8; anti-VEGF; anti-PSCA; anti-CD11a; anti-IgE; anti-receptor de Apo-2; anti-TNF- α ; anti-factor tisular (TF); anti-CD3; anti-CD25; anti-CD34; anti-CD40; anti-tac; anti-CD4; anti-CD52; anti-receptor de Fc; anticuerpos antiantígeno carcinoembrionario (CEA); anticuerpos dirigidos contra las células epiteliales de mama; anticuerpos que se unen a las células de carcinoma de colon; anticuerpos anti-CD33; anti-CD22; anti-EpCAM; anti-Gp11b/IIIa; anti-VSR; anti-CMV; anti-VIH; anti-hepatitis; anti- $\alpha v\beta 3$; anti-carcinoma de células renales humano; anti-17-1A humana; anti-tumor colorrectal humano; anti-melanoma humano; anti-carcinoma de células escamosas humano y antiantígeno leucocitario humano (HLA).

17. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-receptor HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD20, anti-CD11a y anti-CD40.

18. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína diana es una inmunoadhesina.

19. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína diana es una molécula similar a anticuerpo.

20. El método de la reivindicación 19, en el que dicha molécula similar a anticuerpo es una proteína fusionada a, o conjugada con, una región CH2/CH3.

21. El método de la reivindicación 20 en el que dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en renina; hormonas de crecimiento, factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; antitripsina alfa-1; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factor VIIC, factor IX, factor tisular, factor de von Willebrand; proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; uroquinasa, activador del plasminógeno de tipo tisular y de la orina humana (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); seroalbúminas; sustancia inhibidora del factor muleriano; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; beta-lactamasa; DNasa; IgE; antígenos asociados con los linfocitos T citotóxicos (CTLA); inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o de factores de crecimiento; proteínas A o D; factores reumatoides; factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, y -6 (NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6), factores de crecimiento nervioso; factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factores de crecimiento transformante (TGF); factor de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP); proteínas CD; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; proteínas morfogenéticas óseas (BMP); interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), interleucinas IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerante del deterioro; antígenos virales; proteínas de transporte; receptores buscadores, adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas; antígenos asociados a tumor; y fragmentos de los mismos.

22. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de incorporación de la proteína aislada a una formulación farmacéutica.

FIGURA 1

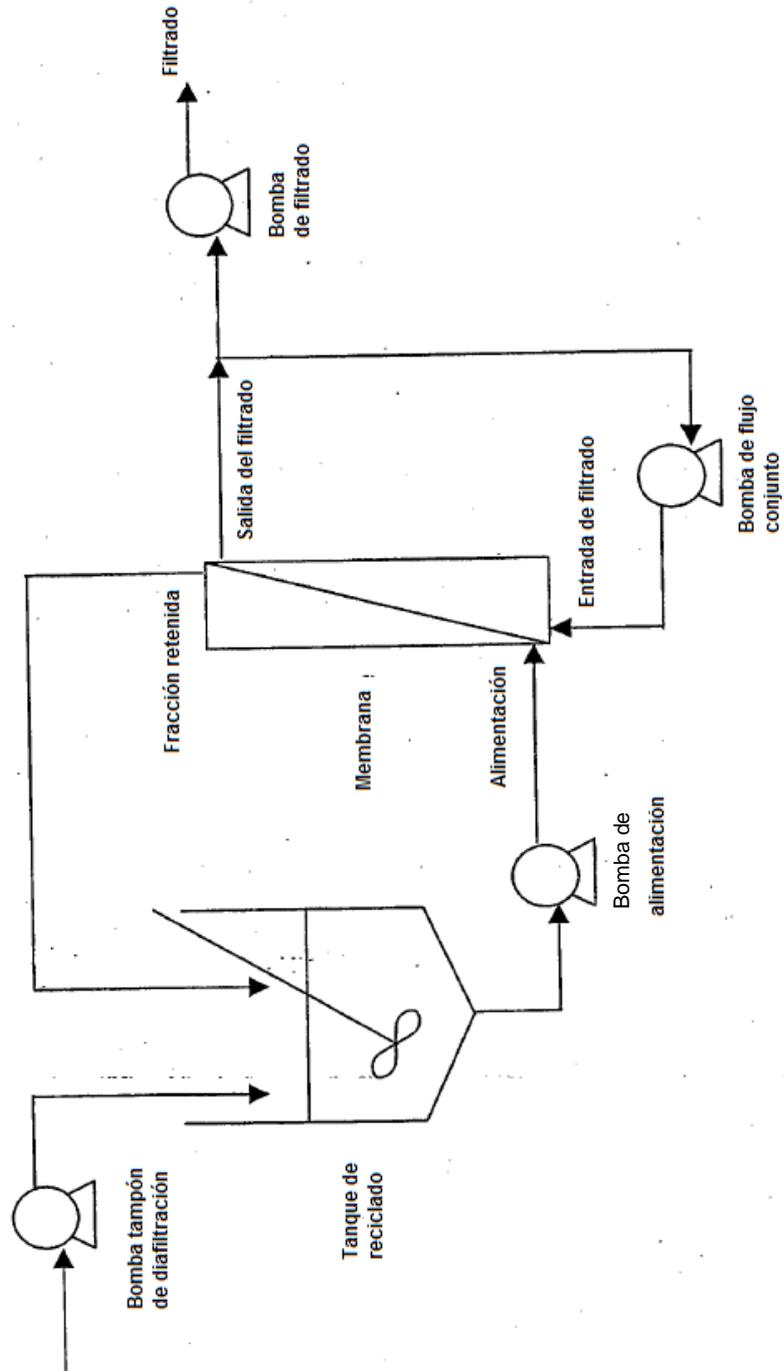


FIGURA 2

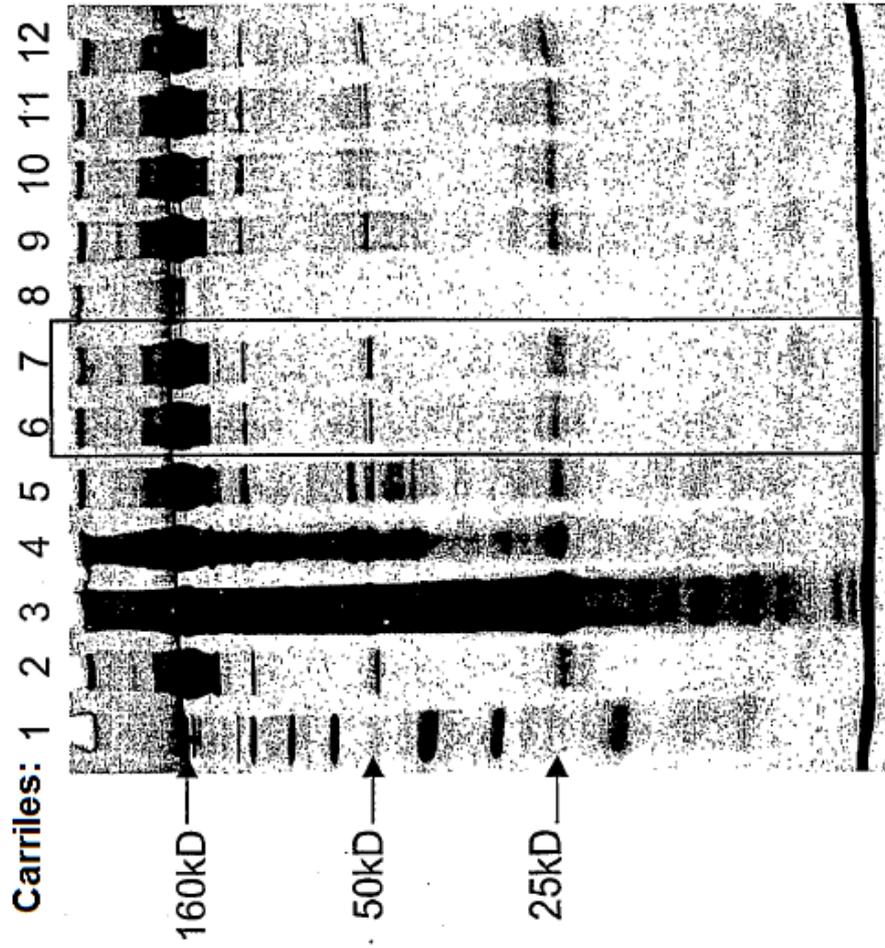


FIGURA 3

Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de rhuMAB anti-HER2 de longitud completa

Figura 3A

Cadena ligera de rhuMAB antiHER2:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEC ID N° 1)

Figura 3B

Cadena pesada de rhuMAB antiHER2:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly (SEC ID N° 2)

FIGURA 4

Secuencia de aminoácidos de la proteína de anticuerpo maduro anti-CD11a

Figura 4A

Cadena ligera de rhu11An anti-CD11a

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASKTISKYLA WYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFS
 GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N° 3)

Figura 4B

Cadena pesada de rhu11An anti-CD11a

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTIGHWMNWRVQAPGKGLEWVGMHPSDSETRY
 NQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFYGTTYFDYWGQGITLVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N° 4)

FIGURA 5
Calidad del producto rhuMAb anti-CD40

