

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 933**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2004 E 04777121 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 1648940**

54 Título: **Reducción de la lixiviación de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A**

30 Prioridad:

28.07.2003 US 490500 P

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

02.08.2016

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**FAHRNER, ROBERT L.;
LAVERDIERE, AMY;
MCDONALD, PAUL J. y
O'LEARY, RHONA M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 578 933 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

Reducción de la lixiviación de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A

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

10 La presente invención se refiere a la purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a un método para reducir la lixiviación de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A reduciendo la temperatura de una composición que se somete a cromatografía de afinidad con proteína A.

Descripción de la técnica relacionada

15 La purificación económica a gran escala de proteínas es un problema cada vez más importante para la industria biotecnológica. Generalmente, las proteínas se producen mediante cultivo celular, usando o bien líneas celulares de mamíferos o bacterianas diseñadas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen para esa proteína. Dado que las líneas celulares usadas son organismos vivos, deben alimentarse con un medio de crecimiento complejo, que contenga azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, normalmente suministrados a partir de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los productos secundarios de las propias células a una pureza suficiente para su uso como agentes terapéuticos de seres humanos plantea un desafío formidable.

25 Los procedimientos para la purificación de proteínas de los restos celulares inicialmente dependen del lugar de expresión de la proteína. Algunas proteínas pueden producirse para secretarse directamente desde la célula al medio de crecimiento circundante; otras se forman intracelularmente. Para las últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, que puede realizarse mediante varios métodos, incluyendo cizalla mecánica, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Tal alteración libera los contenidos completos de la célula en el homogenado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de retirar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se retiran mediante centrifugación o mediante filtración diferencial. El mismo problema surge, aunque a una escala menor, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y la liberación de proteínas intracelulares de la célula huésped en el curso de la ejecución de producción de proteínas.

35 Una vez se ha obtenido una solución clarificada que contiene la proteína de interés, su separación de las otras proteínas producidas por la célula normalmente se intenta usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas según sus cargas, grado de hidrofobicidad o tamaño. Se dispone de resinas diferentes de cromatografía para cada una de estas técnicas, permitiendo la adaptación exacta del esquema de purificación a la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que a las proteínas se les puede ocasionar o bien descender a diferentes velocidades por una columna larga, consiguiendo una separación física que aumenta a medida que pasan más abajo de la columna, o adherirse selectivamente al medio de separación, eluyéndose entonces diferencialmente por diferentes disolventes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo de paso".

50 La cromatografía de afinidad, que aproveche una interacción específica entre la proteína que se purifica y un agente de captura inmovilizado, también puede ser una opción para algunas proteínas. La proteína A 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 kD del *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad (aproximadamente 10^{-8} M a la IgG humana) a la región Fc de los anticuerpos.

55 Las Patentes de Estados Unidos n.º 6.127.526 y 6.333.398 (Blank, G.) describen una etapa intermedia de lavado durante la cromatografía de afinidad con proteína A usando electrolitos hidrófobos, por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio (TMAC) y cloruro de tetraetilamonio (TEAC), para retirar las impurezas, pero no la proteína A inmovilizada o la proteína de interés, unidas a la columna con proteína A.

60 Horenstein et al. (J. Immunol. Methods, 275: 99-112, 2003) describe la purificación de anticuerpos monoclonales murinos de sobrenadantes de cultivos celulares usando un método que comprende la cromatografía de afinidad con proteína A con una única etapa de elución, donde la cromatografía líquida con proteína A se lleva a cabo a aproximadamente 22 °C (temperatura ambiente).

65 El documento WO 98/23645 divulga un método para la purificación de una proteína que comprende una región C_{H2}/C_{H3} , tal como un anticuerpo, que emplea las etapas de (1) someter la proteína a cromatografía con Proteína A, (b) retirar los contaminantes unidos a la fase sólida mediante lavado de la fase sólida con un disolvente con un

electrolito hidrófobo, y (c) recuperar la proteína de la fase sólida.

El documento WO 95/22389 divulga métodos para la purificación de anticuerpos IgG monoméricos usando cromatografía de interacción hidrófoba, que en una realización preferida consiste en tres etapas de purificación: 5 cromatografía de afinidad con proteína A, de intercambio catiónico y de interacción hidrófoba.

Balint et al. (Transfus. Sci., 16(1): 85-94, 1995) investiga la lixiviación de la proteína A de matrices inmunoabsorbentes en composiciones purificadas producidas por una actividad proteasa y la relación con los efectos adversos en pacientes tratados con las composiciones.

10 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de purificación de una proteína que comprende una región C_{H2}/C_{H3} mediante cromatografía de afinidad con proteína A, en el que se lleva a cabo una cromatografía con proteína A 15 inicial a temperatura ambiente de más de 20 °C dando lugar a más de 20 ng de proteína A lixiviada por mg de proteína que está presente en una composición purificada, comprendiendo el método:

- (a) someter una muestra de la proteína y una o más impurezas a cromatografía de afinidad con proteína A, en el que la temperatura de la muestra está a una temperatura reducida en el intervalo de 3 °C a 15 °C,
- (b) recuperar la composición purificada obtenida, y
- (c) medir la proteína A lixiviada en dicha composición purificada,

en el que la lixiviación de la proteína A se reduce en la composición purificada obtenida a una temperatura reducida y dicha composición purificada contiene de 0 ng de proteína A a 15 ng de proteína A por mg de proteína.

Preferentemente la proteína es un anticuerpo, por ejemplo, uno que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en HER2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IgE, CD20, CD40, CD11a, factor tisular (FT), antígeno de células madre de próstata (PSCA), interleucina-8 (IL-8), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER3, HER4, $\alpha 4\beta 7$ o $\alpha 5\beta 3$. En otra realización, la proteína es una inmunoadhesina, tal como una inmunoadhesina del receptor del TNF.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la lixiviación de la proteína A en función de la temperatura para diversos productos de anticuerpos en una PROSEP A™. La proteína A lixiviada se muestra en ng/mg (ng de proteína A por mg de anticuerpo). La temperatura en el eje x se refiere a la temperatura del baño de agua. La columna se ha equilibrado y lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, a pH 7,1, se ha lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0 o 7,1, se ha eluido con o bien citrato 25 mM a pH 2,8, o ácido acético 0,1 M a pH 2,9, se ha regenerado con ácido fosfórico 0,1 M, y se ha almacenado en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0. El Trastuzumab se ha ejecutado en una altura de lecho de 20 cm, se ha cargado a 20 g de Trastuzumab/l de resina, se ha lavado con TMAC a pH 5,0, se ha eluido con citrato 25mM a pH 2,8, y se ha agrupado a partir de 0,1 UA en 2 VC. El 2C4 humanizado se ha ejecutado en una columna de altura de lecho de 20 cm, se ha cargado a 15 g de 2C4 humanizado por litro de resina, se ha lavado con TMAC a pH 7,1, se ha eluido con citrato 25 mM a pH 2,8, y se ha agrupado a partir de 0,1 UA en un volumen conjunto de 2 VC. El anticuerpo de VEGF humanizado se ha ejecutado en una altura de lecho de 14 cm, se ha cargado a 20 g de anticuerpo de VEGF humanizado por litro de resina, se ha lavado con TMAC a pH 5,0, se ha eluido con ácido acético 0,1 M a pH 2,9, y se ha agrupado a partir de 0,2 AU en un volumen conjunto de 2 VC. El anticuerpo CD11a humanizado se ha ejecutado en una altura de lecho de 14 cm, se ha cargado a 20 g de anticuerpo CD11a humanizado por litro de resina, se ha lavado con TMAC a pH 7,1, se ha eluido con ácido acético 0,1 M a pH 2,9, y se ha agrupado a partir de 0,2 UA en 2 VC.

La Figura 2 representa una comparación de la lixiviación de la proteína A dependiente de la temperatura de una PROSEP A™ y PROSEP vA™ con anticuerpo Trastuzumab, 2C4 humanizado y de CD11a humanizado. La proteína A lixiviada se muestra en ng/mg (ng de proteína A por mg de anticuerpo). La temperatura en el eje x se refiere a la temperatura del baño de agua. Todas las columnas tenían un diámetro de 0,66 cm y una altura de 14 cm o de 20 cm. Para cada par de ejecuciones se ha usado un lote de fluido de cultivo celular recogido (FCCR). La columna se ha equilibrado y lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, a pH 7,1, se ha lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0 o 7,1, se ha eluido con o bien citrato 25 mM a pH 2,8, o ácido acético 0,1 M a pH 2,9, se ha regenerado con ácido fosfórico 0,1 M, y se ha almacenado en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 en 40 VC/h. El anticuerpo CD11a humanizado se ha ejecutado en una altura de lecho de 14 cm, se ha cargado a 20 g de anticuerpo CD11a humanizado por litro de resina, se ha lavado con TMAC a pH 7,1, se ha eluido con ácido acético 0,1 M a pH 2,9, y se ha agrupado a partir de 0,2 UA en 2 VC. El 2C4 humanizado se ha ejecutado en una columna de altura de lecho de 20 cm, se ha cargado a 15 g de 2C4 humanizado por litro de resina, se ha lavado con TMAC a pH 7,1, se ha eluido con citrato 25 mM a pH 2,8, y se ha agrupado a partir de 0,1 UA en un volumen conjunto de 2 VC. El Trastuzumab (de planta piloto a una escala de 400 l a una concentración de 0,57 mg/ml) se ha ejecutado en una altura de lecho de 20 cm, se ha cargado a 20 g de Trastuzumab/l de resina, se ha lavado con TMAC a pH 5,0, se ha eluido con citrato 25mM a

pH 2,8, y se ha agrupado a partir de 0,1 UA en 2 VC.

La Figura 3 representa la lixiviación de la proteína A a escala piloto frente a la temperatura. La proteína A lixiviada se muestra en ng/mg (ng de proteína A por mg de anticuerpo). La temperatura en el eje x se refiere a la temperatura programada del tanque de FCCR. La columna se ha rellenado con 1,26 l de PROSEP vA™, de 9 cm de diámetro por 20 cm de alto. El FCCR de Trastuzumab era de 0,59 mg/ml y la temperatura del FCCR en el tanque se ha mantenido a 10, 15, 20, 25 o 30 °C. La columna se ha cargado a 20 g de Trastuzumab por litro de resina. La temperatura se ha medido en el tanque de FCCR, entre la bomba y la columna, y a la salida de la columna. La columna se ha equilibrado y lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, a pH 7,1, se ha lavado con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0, se ha eluido con citrato 25 mm a pH 2,8, se ha regenerado con ácido fosfórico 0,1 M, y se ha almacenado en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0. Se ha tomado una muestra de cada FCCR y se ha ejecutado a escala de laboratorio en una columna de 0,66 cm de diámetro por 20 cm de alto rellena con PROSEP vA™ usando los mismos tampones que a escala piloto, representado en el gráfico por los círculos.

Las Figuras 4A-B muestran la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2), respectivamente, de Trastuzumab (HERCEPTIN®).

Las Figuras 5A-B representan la secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la ligera (SEQ ID NO: 3) y variables de la pesada (SEQ ID NO: 4), respectivamente, de un 2C4 humanizado.

Las Figuras 6A-B representan las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la ligera (SEQ ID NO: 5) y variables de la pesada (SEQ ID NO: 6), respectivamente, de un anticuerpo CD11a humanizado RAPTIVA™.

Las Figuras 7A-B representan las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la ligera (SEQ ID NO: 7) y variables de la pesada (SEQ ID NO: 8), respectivamente, de un anticuerpo de VEGF humanizado AVASTIN™.

La Figura 8 representa el efecto del EDTA y la temperatura en la lixiviación de la proteína A.

La Figura 9 representa el efecto del fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo clorhidrato (AEBSF) (PEFABLOC®), un inhibidor de la serina proteasa, en la lixiviación de la proteína A.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones:

Cuando se usa en el presente documento, el término “proteína A” incluye una proteína A recuperada de una fuente originaria de la misma, una proteína A producida sintéticamente (por ejemplo mediante síntesis de péptidos o mediante técnicas recombinantes), incluyendo variantes o derivadas de la misma que retienen la capacidad para unirse a proteínas que tienen una región C_{H2}/C_{H3}. La proteína A puede adquirirse en el mercado de Repligen, Pharmacia and Fermentech.

La “cromatografía de afinidad con proteína A” se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o partículas usando la proteína A, donde la proteína A generalmente se inmoviliza en una fase sólida. Una proteína que comprende una región C_{H2}/C_{H3} puede unirse reversiblemente a, o adsorberse por, la proteína A. Los ejemplos de columnas de cromatografía de afinidad con proteína A para su uso en la cromatografía de afinidad con proteína A en el presente documento incluyen proteína A inmovilizada en un segmento principal de vidrio de poro controlado, incluyendo las columnas PROSEP A™ y PROSEP vA™ (Millipore Inc.); proteína A inmovilizada en una fase sólida de poliestireno, por ejemplo, la columna POROS 50A™ (Applied BioSystems Inc.); o proteína A inmovilizada en una fase sólida de agarosa, por ejemplo las columnas rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (Amersham Biosciences Inc.).

Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que la proteína A puede adherirse o unirse covalentemente. La fase sólida puede comprender, por ejemplo, una superficie de vidrio, sílice, poliestireno o agarosa para la inmovilización de la proteína A. La fase sólida puede ser una columna de purificación, una fase discontinua de partículas individuales, una columna de lecho empacado, una columna de lecho expandido, una membrana, etc.

En el presente documento, “lixiviación” se refiere a la separación o lavado de la proteína A (incluyendo fragmentos de la misma) de una fase sólida a la que está unida. La lixiviación puede ser el resultado de diversos mecanismos tales como una rotura mecánica, exposición a pH bajo, actividad proteolítica, etc.

Una “impureza” es un material que es diferente del producto de proteína deseado. La impureza puede ser una impureza viral, una variante de la proteína deseada u otra proteína, ácido nucleico, endotoxina, etc. Los ejemplos específicos de impurezas en el presente documento incluyen proteínas de la célula huésped productoras de la proteína deseada (por ejemplo proteínas del ovario del hámster chino, CHOP, donde la célula huésped es una célula de CHO), proteasa(s), proteína A lixiviada, etc.

Las “proteasas” son enzimas proteolíticas que incluyen, pero sin limitación, serina, cisteína, metalo- y aspártico proteasas. Las proteasas presentes en una composición que comprende una proteína de interés pueden derivarse de un huésped recombinante productor de la proteína, o de una fuente natural de la proteína. Los ejemplos de proteasas incluyen termolisina, tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreína, trombina, papaina, plasmina, catepsina

B, renina, quimosina etc.

La "actividad proteasa" se refiere a la actividad enzimática de una o más proteasas. Tal actividad puede medirse, por ejemplo, indirectamente midiendo la lixiviación de la proteína A. La actividad puede reducirse reduciendo la temperatura de una composición que comprende la(s) proteasa(s), y/o añadiendo uno o más inhibidores de proteasas a la composición etc.

Un "inhibidor de proteasas" es un compuesto o composición que reduce, en cierta medida, la actividad enzimática de la(s) proteasa(s). Los ejemplos de inhibidores de proteasas incluyen fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo, clorhidrato (AEBSF) (PEFABLOC® SC), leupeptina, pepstatina, benzamidina, un quelante de iones metálicos tal como EDTA o imidazol para la inhibición de la actividad metaloproteasa etc. Los inhibidores de proteasas preferidos inhiben la actividad de metaloproteasas (por ejemplo EDTA) y/o inhiben ciertas actividades de la serina proteasa.

La proteína de interés en el presente documento es una que comprende una región C_H2/C_H3 y por lo tanto es susceptible de purificación mediante cromatografía de afinidad con proteína A. El término "región C_H2/C_H3 " cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la proteína A. En realizaciones preferidas, la región C_H2/C_H3 comprende una región C_H2 intacta seguido de una región C_H3 intacta, y más preferentemente comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Los ejemplos de proteínas que contienen regiones C_H2/C_H3 incluyen anticuerpos, inmunoadhesinas y proteínas de fusión que comprenden una proteína de interés fusionada a, o conjugada con, una región C_H2/C_H3 .

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando retengan, o estén modificados para comprender, una región C_H2/C_H3 como se define en el presente documento.

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

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único lugar antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el que se obtiene de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usarse de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse mediante el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particulares, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81:6851-6855 (1984)).

El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., 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 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos "de sostén" o "FR" son los residuos del dominio variable además de los residuos de la región hipervariable

tal como se define en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de sostén (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Esas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado esencialmente comprenderá la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o esencialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o esencialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse 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 "adhesina" heteróloga (por ejemplo, un receptor, ligando o encima) con las funciones efectoras de un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada que es distinta al lugar de reconocimiento del antígeno y de unión (lugar de combinación del antígeno) de un anticuerpo (es decir es "heterólogo") y una secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina se deriva preferentemente de las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ ya que las inmuno adhesinas que comprenden estas regiones pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad con proteína A (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)).

El término "dominio de unión al ligando" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier receptor o cualquier región de la superficie celular nativa o derivado de los mismos que retiene al menos una unión al ligando cualitativa 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 familia supergen de las inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la familia supergen de las inmunoglobulinas pero sin embargo están específicamente cubiertos por esta definición, son los receptores para citoquinas, y en particular los receptores con actividad tirosina quinasa (receptores tirosina quinasa), miembros de las súper familias del receptor de la hematopoyetina y del factor de crecimiento del nervio, y moléculas de adhesión celular, por ejemplo selectinas (E-, L- y P-).

El término "dominio de unión al receptor" se usa para designar cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que retiene al menos una capacidad cualitativa de unión al receptor de un ligando nativo correspondiente. Esta definición, entre otras, incluye específicamente las secuencias de unión de los ligandos para los receptores mencionados anteriormente. Una "quimera anticuerpo-inmuno adhesina" comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo (como se define en el presente documento) con al menos una inmuno adhesina (como se define en esta solicitud). Las quimeras anticuerpo-inmuno adhesina ejemplares son las quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas en Berg et al., *PNAS* (Estados Unidos) 88:4723-4727 (1991) y Chamow et al., *J. Immunol.* 153:4268 (1994).

El término "HER2" se refiere a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et al., *PNAS* (Estados Unidos) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986) (Genebank número de adhesión X03363).

El "Trastuzumab" o "HERCEPTIN®" es un anticuerpo de HER2 humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, o las variantes de la secuencia de aminoácidos de las mismas que retienen la capacidad de unir HER2 e inhibir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan HER2 (véase la patente de Estados Unidos 5.677.171).

El "2C4 humanizado" es un anticuerpo de HER2 humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la ligera variable de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de la pesada variable de SEQ ID NO: 4, o las variantes de la secuencia de aminoácidos de las mismas que retiene la capacidad de unir HER2 y bloquear la activación por ligando del HER2 (véase el documento WO 01/00245).

Modos para llevar a cabo la invención

El proceso en el presente documento implica la purificación de una proteína que contiene una región C_H2/C_H3 de impurezas mediante cromatografía de afinidad con proteína A. En realizaciones preferidas, la proteína es un

anticuerpo, una inmunoadhesina o una proteína fusionada a, o conjugada con, una región CH_2/CH_3 . A continuación se analizan técnicas para generar dichas moléculas.

1. Anticuerpos

5 La proteína preferida de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo. Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero sin limitación: anticuerpos anti-HER2 que incluyen Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:4285-4289 (1992), Patente de Estados Unidos n.º 5.725.856) y 2C4 humanizado (documento WO01/00245, Adams et al.); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quiméricos "C2B8" como en la Patentes de Estados Unidos n.º 5.736.137 (RITUXAN®), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la Patente de Estados Unidos n.º 5.721.108B1, o Tositumomab (BEXXAR®); anticuerpos anti-IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993), y la Publicación Internacional n.º WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o de afinidad madura tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN® (Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), Publicación Internacional n.º WO 96/30046, y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos anti-antígeno de células madre de próstata (PSCA) (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluyendo variantes S2C6 y humanizadas de los mismos (documento WO00/75348); anticuerpos anti-CD11a (Patente de Estados Unidos n.º 5.622.700, documentos WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991), y Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)); anti-CD18 (Patente de Estados Unidos n.º 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); anticuerpos anti-IgE (incluyendo E25, E26 y E27; Patente de Estados Unidos n.º 5.714.338, presentada el 3 febrero de 1998 o Patente de Estados Unidos n.º 5.091.313, presentada el 25 febrero 1992, el documento WO 93/04173 publicado el 4 marzo 1993 o la Solicitud Internacional n.º PCT/US98/13410 presentada el 30 junio de 1998, Patente de Estados Unidos n.º 5.714.338, Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993) y la Publicación Internacional n.º WO 95/19181); anticuerpos 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 (Véanse, la Patente de Estados Unidos n.º 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)); anticuerpos anti-factor tisular (FT) (Patente Europea n.º 0 420 937 B1 aceptada el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ humana (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (Patente de Estados Unidos n.º 4.515.893 presentada el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-Tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (Véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.693.792 presentada el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1 H (Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)); anticuerpos anti-receptor Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra $Fc\gamma RI$ como en Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos contra las células epiteliales de pecho incluyendo huBreE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman et al. Cancer Res. 55(23 Suppl): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a la células de carcinoma de colón tales como C242 (Litton et al. EurJ. 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-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpos anti-CA 125, tales como OvaRex; anticuerpo BEC 2 anti-idiotípico del epítipo de GD3; anticuerpos anti- $av\beta_3$, incluyendo VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo 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 anti-antígeno de leucocito humano (HLA) tales como el anticuerpo Smart ID 10 y el anti-HLA DR Oncolym (Lym-1). Los antígenos diana preferidos para el anticuerpo en el presente documento son: el receptor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a y CD40.

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

(i) Selección y preparación del antígeno

60 El anticuerpo en el presente documento se dirige 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 dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipéptidos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumores; véase la Patente de Estados Unidos 5.091.178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una

molécula transmembrana (por ejemplo receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen las proteínas descritas en la sección (3) a continuación. Las dianas moleculares ejemplares para los anticuerpos incluidos en la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD34; miembros de la familia del receptor ErbB tales como el receptor EGFR, HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como integrina LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e $\alpha\beta$ 3 incluyendo o bien subunidades α o β de las mismas (por ejemplo anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C o cualquiera de los otros antígenos que se han mencionado el presente documento.

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, pueden usarse como inmunógenos para la generación de anticuerpos. Para las moléculas transmembrana, tales como receptores, los fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) pueden usarse como el inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana pueden usarse como el 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 la preparación de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

(ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se cultivan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno a una proteína que sea inmunogénica en las especies a inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando 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 combinación, 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 vía intradérmica en múltiples lugares. Un mes después los animales se estimulan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples lugares. De siete a 14 días después se les extrae sangre a los animales y el suero se ensaya para el título de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden fabricarse en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. También, se usan adecuadamente agentes agregantes tales como alumbre para aumentar la respuesta inmune.

(iii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para tener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada 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 hibridoma. (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células hibridomas preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, mantienen la producción estable de un alto nivel de 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 las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California Estados Unidos, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture

Collection, Rockville, Maryland Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también se han descrito 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., Nueva York, 1987)).

5 El medio de cultivo en el que las células hibridomas están creciendo se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células hibridomas se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

10 Después de que se identifiquen las células hibridomas que producen anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células hibridomas pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores con ascitis en un animal.

15 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Preferentemente se usa el procedimiento de cromatografía de afinidad con proteína A descrito en el presente documento.

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

25 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina.

30 Normalmente dichos polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un lugar de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un lugar de combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro lugar de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

35 En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generados usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por el mezclado de las cadenas ng (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como la combinación de la infección y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir 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 del hibridoma tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

40 Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan como residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización esencialmente puede llevarse a cabo siguiendo el método de Winter y colaboradores (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 secuencias de los CDR o del CDR de un roedor por las frecuencias correspondientes de anticuerpos humanos. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que esencialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. 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 lugares análogos en los anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usarse en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza frente a la biblioteca completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como el FR humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)). Otro método usa un sostén particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo sostén puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la materia. Los programas informáticos que están disponibles ilustran y muestran posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas demostraciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias receptoras y de importación de tal manera que se consiguen las características del anticuerpo deseadas, tales como una afinidad aumentada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más esencialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen (J_H) de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la variedad del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 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 pueden derivarse de bibliotecas de presentación de 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)).

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, 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 huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos de fagos que se han discutido anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente del *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos se incluyen mediante esta expresión cuando se usan en el presente documento.

Se conocen en la técnica los métodos para la fabricación de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica apropiada. La purificación de la molécula apropiada, que normalmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante difícil de manejar, 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 interconexión entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interconexión preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de un anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interconexión de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interconexión de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede unirse a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos n.º 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 cualquiera de los métodos de reticulación convenientes. Se conocen bien en la técnica los agentes de reticulación adecuados, y se divulgan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una cantidad de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlaces químicos. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se fragmentan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol de arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte después en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden unirse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico humanizado completamente. Cada fragmento Fab' se ha secretado por separado de *E. coli* y se ha sometido a una unión química dirigida *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado ha sido capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T normales de ser humano, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra las dianas de tumores de pecho humano.

También se han descrito diversas técnicas para la producción y aislamiento de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de las cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se han unido a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros del anticuerpo se han reducido en la región bisagra para formar monómeros y después se han reoxidado para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para la fabricación de fragmentos de anticuerpo 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 conector 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 complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando de este modo dos lugares de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para la fabricación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994). Como alternativa, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales", como se ha descrito en Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Resumiendo, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en línea (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman una par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

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

2. Inmunoadhesinas

El diseño más sencillo y directo de inmunoadhesinas combina el/los dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) 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 de manera C terminal al ácido nucleico que codifica el N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, las fusiones N-terminal también son posibles.

Normalmente, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos una bisagra funcionalmente activa, los dominios C_{H2} y C_{H3} de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se fabrican en el C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o N-terminal inmediato al C_{H1} de la cadena pesada o la correspondiente región de la cadena ligera. El lugar preciso en el que se fabrica la fusión no es crítico; los lugares particulares se conocen bien y pueden seleccionarse para optimizar las características de actividad biológica, secreción, o de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de la adhesina se fusiona al N-terminal del dominio Fc de inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar la región constante de la cadena pesada completa a la secuencia de la adhesina. Sin embargo, más preferentemente, se usa en la fusión una secuencia que empieza en la región bisagra justo aguas arriba del lugar de fragmentación de la papaina que define químicamente la Fc de la IgG (es decir, residuo 216, tomando el primer residuo de la región constante de la cadena pesada que es 114), o lugares 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 las 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; la IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en formas multiméricas en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

A continuación se muestra un esquemáticamente en forma de diagrama las diversas inmunoadhesinas ensambladas ejemplares dentro del alcance del presente documento:

- (a) A_{C_L}-A_{C_L};
- (b) A_{C_H}-(A_{C_H}, A_{C_L}-A_{C_H}, A_{C_L}-V_HC_H, o V_LC_L-A_{C_H});
- (c) A_{C_L}-A_{C_H}-(A_{C_L}-A_{C_H}, A_{C_L}-V_HC_H, V_LC_L-A_{C_H}, o V_LC_L-V_HC_H);
- (d) A_{C_L}-V_HC_H-(A_{C_H}, o A_{C_L}-V_HC_H, o V_LC_L-A_{C_H});
- (e) V_LC_L-A_{C_H}-(A_{C_L}-V_HC_H, o V_LC_L-A_{C_H}); y
- (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

en el que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesinas 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 de 1;

Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

Resumiendo, las estructuras anteriores solo muestran características claves; no indican los dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas; ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando dichos dominios se requieren para la actividad de unión, se construirán para estar presentes en las ubicaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

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

A pesar de que no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en las inmunoadhesinas de la presente invención, puede estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina o bien asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de la cadena pesada de adhesina-inmunoglobulina, o directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina normalmente se coexpresa con el ADN que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada de adhesina-inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán de manera covalente para proporcionar una estructura similar a la inmunoglobulina que comprende pares de cadenas pesadas – cadenas ligeras de inmunoglobulina unidas por disulfuro. Los métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567, presentada el 28 marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen de la manera más conveniente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la parte de la adhesina en la estructura de una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también

puede usarse la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (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. Los ADNc que codifican las regiones constantes de la cadena pesada de IgG pueden aislarse basándose en secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos del bazo o de sangre periférica, mediante hibridación o mediante las técnicas 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 línea en un vector plásmido que dirige la expresión eficaz en las células huésped escogidas.

3. Otras proteínas que contienen la región C_H2/C_H3

En otras realizaciones, la proteína que se purifica es una que se fusiona a, o se conjuga con, una región C_H2/C_H3. Dichas proteínas de fusión pueden producirse con el fin de aumentar la vida media en suero de la proteína y/o facilitar la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Los ejemplos de proteínas biológicamente importantes que pueden conjugarse de esta manera incluyen renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno del tipo tejido (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulado en la activación de células T normalmente expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1 alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora Muelleriana; 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; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-GF-I (IGF-I de cerebro), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón -alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor acelerador de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor EGFR, HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos que se han indicado anteriormente.

4. Cromatografía de afinidad con proteína A

La proteína que se purifica usando el método descrito en el presente documento generalmente se produce usando técnicas recombinantes o se aísla de una fuente nativa de la misma. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.534.615 y 4.816.567.

Preferentemente la proteína o el producto de interés que contiene la región C_H2/C_H3 es un anticuerpo, por ejemplo uno que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en HER2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IgE, CD20, CD40, CD11a, factor tisular (FT), antígeno de células madre de próstata (PSCA), interleucina-8 (IL-8), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER3, HER4, α4β7 o α5β3. Por ejemplo, se ha encontrado que el anticuerpo que puede unirse al antígeno HER2 como lixiviante de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A de dichos anticuerpos es particularmente problemático. Los ejemplos más específicos de anticuerpos en el presente documento incluyen Trastuzumab, 2C4 humanizado, anticuerpo CD11a humanizado o anticuerpo de VEGF humanizado. Otras proteínas que contienen la región C_H2/C_H3 de interés particular en el presente documento son las inmunoadhesinas, por ejemplo, las inmunoadhesina del receptor de TNF (por ejemplo, etanercept, ENBREL®).

Cuando se usan las técnicas recombinantes, la proteína puede producirse intracelularmente, en el espacio periplasmático, o se secreta directamente en el medio. Si la proteína se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, o bien de células huésped o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando la proteína se secreta en el medio, las células huésped recombinantes también pueden separarse del medio de cultivo celular mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración en flujo tangencial.

El método en el presente documento reduce la lixiviación de la proteína A que puede ocurrir durante la cromatografía de afinidad con proteína A de una composición que comprende una proteína que contiene la región C_{H2}/C_{H3} y una o más impurezas.

5 En una realización, se evalúa en primer lugar la susceptibilidad de la proteína que se asocia con la lixiviación de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A. Por lo tanto, la proteína se somete a cromatografía de afinidad con proteína A y se determina la lixiviación de la proteína A en la composición recuperada. Por ejemplo, cuando la composición recuperada comprende más de aproximadamente 20 ng de proteína A por mg de proteína de interés (ng/mg), por ejemplo, de aproximadamente 20 ng/mg a aproximadamente 500 ng/mg de proteína A, esto
10 puede considerarse niveles inaceptables de proteína A lixiviada, en cuyo caso la posterior purificación cromatográfica con proteína A de la proteína incluirá una(s) etapa(s) que reduzca la cantidad de proteína A en la composición recuperada. Preferentemente, la cantidad de proteína A en la composición proteica recuperada siguiendo la implementación de esta(s) etapa(s) está en el intervalo de aproximadamente 0 ng de proteína A por mg de proteína de interés (ng/mg) a aproximadamente 15 ng/mg.

15 La lixiviación de la proteína A puede medirse usando diversas técnicas incluyendo el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), SDS PAGE, Western blot, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masas, etc.

20 El ensayo preferido para la medición de la proteína A lixiviada es el ELISA. Por ejemplo, puede usarse un ELISA sandwich. En este formato de ensayo, un anticuerpo anti-proteína A puede recubrirse en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras pueden diluirse a 0,2 mg/ml de anticuerpo del producto y aplicarse en los pocillos. La proteína A en las muestras se une al anticuerpo de recubrimiento y la cantidad de proteína A unida puede detectarse con el anti-proteína A unido a peroxidasa de rábano (HRP). Para evitar que el anticuerpo del producto inhiba la unión de la proteína A al anticuerpo de recubrimiento y al anticuerpo conjugado con HRP, uno
25 puede analizar la inhibición ejercida por el anticuerpo del producto en muestras diluidas usando curvas patrón de la proteína A individual que se inyectan con 0,2 mg/ml de anticuerpo homólogo del producto. Aunque este método consume más tiempo y es más costoso, proporciona una determinación más exacta y precisa de los niveles de proteína A. Un ELISA sándwich de proteína A ejemplar se describe en más detalle en el ejemplo a continuación.

30 Preferentemente, el método comprende la reducción de la temperatura de la composición sometida a la cromatografía de afinidad con proteína A, por ejemplo cuando la temperatura de la composición se reduce por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 20 °C, por ejemplo, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 18 °C. La temperatura de la composición puede reducirse antes de y/o durante la cromatografía de afinidad con proteína A de la misma. Sin embargo, de acuerdo con la realización preferida de la invención, el método comprende la disminución de la temperatura de la composición antes de someter la composición a cromatografía de afinidad con proteína A, por ejemplo,
35 disminuyendo la temperatura del fluido del cultivo celular cosechado (FCCR) que se somete a la cromatografía.

40 En una realización, la reducción de la temperatura como se ha divulgado anteriormente se combina con uno o más métodos para reducir la lixiviación de la proteína A, por ejemplo añadiendo inhibidor(es) de la proteasa y/o disminuyendo el pH de la composición que se somete a la cromatografía de afinidad con proteína A.

45 Los inhibidores de la proteasa (tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo clorhidrato (AEBSF) (PEFABLOC® SC), pepstatina, benzamidina y/o un quelante de iones metálicos tal como EDTA o imidazol para la inhibición de la actividad de la metaloproteasa) pueden añadirse a la composición que se somete a la cromatografía de afinidad con proteína A. Los inhibidores de la proteasa preferidos inhiben la actividad de la metaloproteasa (por ejemplo EDTA) y/o inhiben ciertas actividades de la serina proteasa. Por ejemplo, uno puede añadir el/los inhibidor(es) de la proteasa a la composición sometida a la cromatografía de
50 afinidad con proteína A en una cantidad de aproximadamente 0,001 μM a aproximadamente 100 mM. El/los inhibidor(es) de la proteasa puede añadirse a la composición antes y/o durante la cromatografía de afinidad con proteína A.

55 La presente invención también contempla la disminución del pH de la composición antes de someterla a cromatografía de afinidad con proteína A, por ejemplo a un pH en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5, para reducir la lixiviación de la proteína A.

A continuación se describirán diversos tampones de equilibrado, carga, lavado y elución y métodos ejemplares.

60 Como etapa preliminar opcional, la fase sólida para la cromatografía de afinidad con proteína A puede equilibrarse con un tampón adecuado antes de la cromatografía de la proteína de interés. Por ejemplo, el tampón de equilibrado puede ser Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1.

65 Después puede cargarse la preparación que comprende la proteína de interés en la fase sólida equilibrada usando un tampón de carga que puede ser el mismo que el tampón de equilibrado. A medida que la preparación contaminada fluye a través de la fase sólida, la proteína se adsorbe a la proteína A inmovilizada.

Algunas veces, ciertas impurezas (tales como proteínas del ovario de hámster chino, CHOP, cuando la proteína se produce en una célula de CHO) pueden unirse de manera no específica a la fase sólida, proteína o proteína A. Si esto ocurre, puede usarse una "etapa intermedia de lavado" para retirar dichas impurezas antes de la elución de la proteína de interés. La fase sólida puede equilibrarse con tampón de equilibrado antes de comenzar la etapa intermedia de lavado.

En una realización, la etapa intermedia de lavado se lleva a cabo usando un disolvente con un electrolítico hidrófobo, por ejemplo cuando el electrolito hidrófobo en el disolvente de lavado es TMAC y/o TEAC. Véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 6.127.526 y 6.333.398 (Blank, G.). Aunque un solo electrolito hidrófobo puede estar presente en el disolvente de lavado, en ciertas realizaciones, pueden usarse dos o más de dichos electrolitos. El electrolito hidrófobo se añade preferentemente a una solución tamponada a un pH que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. Los tampones adecuados para este fin incluyen tampones Tris, fosfato, MES y MOPSO. La concentración final preferida para el electrolito hidrófobo en el disolvente de lavado está el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 M, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 M.

En una realización alternativa, el tampón de lavado intermedio puede comprender sal y un compuesto adicional, en donde el compuesto adicional es (a) un detergente (preferentemente polisorbato, por ejemplo polisorbato 20 o polisorbato 80); (b) un disolvente (preferentemente hexilenglicol); y (c) un polímero (preferentemente PEG).

La sal empleada puede seleccionarse basándose en la proteína de interés, pero preferentemente es acetato (por ejemplo acetato de sodio), especialmente cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2 tal como Trastuzumab; o citrato (por ejemplo citrato de sodio), particularmente cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti-IgE tal como E26.

Las cantidades de la sal y del compuesto adicional en la composición son tales que la cantidad combinada eluye la impureza o impurezas, sin retirar sustancialmente la proteína de interés. Las concentraciones de sal preferidas en dichos tampones de lavado son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 M, y más preferentemente de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,6 M. Las concentraciones útiles del detergente son del aproximadamente 0,01 al aproximadamente 5 %, más preferentemente del aproximadamente 0,1 al 1 %, y más preferentemente del aproximadamente 0,5 %, por ejemplo cuando el detergente es polisorbato. Las concentraciones del disolvente ejemplares son del aproximadamente 1 % al 40 %, preferentemente del aproximadamente 5 al aproximadamente 25 %. La concentración preferida del disolvente (hexilenglicol) para E26 es aproximadamente del 20 %, mientras que para Trastuzumab la concentración preferida del disolvente (de nuevo hexilenglicol) es aproximadamente del 10 %. Cuando el compuesto adicional es un polímero (por ejemplo PEG 400 o PEG 8000), la concentración del mismo puede ser, por ejemplo, del aproximadamente 1 % al aproximadamente 20 %, preferentemente del aproximadamente 5 % al aproximadamente 15 %.

En otra realización, la etapa intermedia de lavado implica el uso de una solución de tampón altamente concentrada, por ejemplo un tampón a una concentración de más de aproximadamente 0,8 M, por ejemplo hasta aproximadamente 2 M, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,8 M a aproximadamente 1,5 M, más preferentemente aproximadamente 1 M. En esta realización, el tampón es preferentemente un tampón Tris, tal como Tris acetato.

El pH del tampón de lavado intermedio es preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, más preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, y más preferentemente aproximadamente 5,0. En otra realización preferida, el pH es aproximadamente 7,0.

La proteína de interés puede recuperarse de la columna, usando un tampón de elución adecuado. La proteína puede eluirse de la columna, por ejemplo, usando un tampón de elución que tiene un pH bajo, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5. Los ejemplos de tampones de elución para este fin incluyen tampones citrato o acetato. La preparación de proteína eluida puede someterse a etapas de purificación adicionales o bien antes, o después, de la etapa de cromatografía de afinidad con proteína A. Las etapas de purificación adicionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, filtración, cromatografía de hidroxilapatita, diálisis, cromatografía de afinidad usando un anticuerpo para capturar la proteína; cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa; cromatografía en sílice; cromatoenfocue; filtración en gel, etc.

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

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

Ejemplo 1**Reducción de la temperatura para la reducción de la lixiviación de la proteína A****5 Durante la cromatografía de afinidad con proteína A**

La cromatografía de afinidad con proteína A es una herramienta potente y ampliamente usada para la purificación de anticuerpos. Retira eficazmente las proteínas, ADN y moléculas pequeñas de las células huésped del producto. El fluido del cultivo celular cosechado (FCCR) puede cargarse directamente en la resina y el anticuerpo unirse a la proteína A. El pH bajo eluye el anticuerpo unido, pero puede transportar la proteína A lixiviada al conjunto de productos. Dado que el ligando proteína A es inmunogénico, derivado de *Staphylococcus aureus*, debe limpiarse del grupo de productos mediante el procesamiento aguas abajo.

Para caracterizar la dependencia de la temperatura de la lixiviación de la proteína A, se evaluó el efecto de la temperatura en la lixiviación de la proteína A con respecto a las siguientes proteínas:

1. Anticuerpo de HER2 humanizado recombinante Trastuzumab (HERCEPTIN®); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:4285-4289 (1992), Patente de Estados Unidos n.º 5.725.856, Patente de Estados Unidos n.º 5.821.337, y Figs. 4A-B en el presente documento.
2. Anticuerpo CD11a humanizado MHM24, RAPTIVA™; Werther et al. J. Immunology 157: 4986-4995 (1996), Patente de Estados Unidos n.º 5.622.700, documento WO 98/23761, y Figs. 6A-B en el presente documento.
3. Anticuerpo de VEGF humanizado A4.6.1, F(ab)-12, AVASTIN®; Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), Presta et al. Cancer Research 57: 4593-4599 (1997), Publicación Internacional n.º WO 96/30046, WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998, y Figs. 7A-B en el presente documento.
4. 2C4 humanizado; documento WO01/00245, y Figs. 5A-B en el presente documento.

Materiales y métodos

A pequeña escala: se realizaron todos los experimentos a pequeña escala usando un AKTA EXPLORER 100™. La temperatura se controló mediante la inmersión de la columna y la línea de aguas arriba de acero inoxidable de 5 ml en un baño de agua controlado a la temperatura deseada de la ejecución. La línea de entrada actuó como intercambiador de calor enfriando o calentando el FCCR antes de entrar a la columna con proteína A, similar al efecto del enfriamiento del FCCR en un tanque a escala industrial. La temperatura de salida se midió para asegurar que se alcanzó la temperatura deseada.

Se llevaron a cabo varios conjuntos de ejecuciones con proteína A para determinar la dependencia de la temperatura de la lixiviación de la proteína A de una PROSEP A™ y una PROSEP vA™ para diversos anticuerpos. Se ensayaron diversos lotes de cada tipo de resina. Cada condición se ensayó por triplicado. La columna se precicló con tres volúmenes de columna (VC) de tampón de elución y tres VC de tampón de regeneración antes de cada uso, y se almacenaron en acetato de sodio 0,1 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 después de cada uso. El Trastuzumab se ejecutó a 7 niveles de temperatura (10,12, 15, 18, 20, 25 y 30 °C). Los otros anticuerpos se ejecutaron a 3 niveles de temperatura (10, 20 y 30 °C). Las temperaturas se precisaron para reducir el error sistemático. Se compararon el FCCR de Trastuzumab de las seis ejecuciones de 400 l. Usando un lote de FCCR de Trastuzumab en un lote de resina a 20 °C, se estudió el efecto de la altura del lecho en la lixiviación de la proteína A.

Escala piloto: los experimentos a escala piloto se ejecutaron con FCCR de Trastuzumab. El FCCR se almacenó y refrigeró en un tanque con camisa de 400 l. La temperatura del FCCR se controló en 1 °C de la temperatura deseada. Se midió la temperatura en el tanque, después de la bomba pero antes de la columna, y a la salida de la columna. La columna se pre-cicló con 3 VC de tampón de elución y 3 VC de tampón de regeneración antes de cada uso, y se almacenaron en acetato de sodio 0,1 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 después de cada uso. El Trastuzumab se ejecutó a 7 niveles de temperatura (10,12, 15, 18, 20, 25 y 30 °C). Las temperaturas se precisaron para reducir el error sistemático.

A gran escala (cultivo celular de 12.000 l): La columna PROSEP vA™ era de 80 cm de diámetro por 20 cm de alto para un volumen total de 100,5 l. Se recuperaron cinco cosechas a través de la etapa con proteína A. El FCCR se recogió y se mantuvo a 15 +/- 3 °C durante la duración de la carga.

Análisis: La DO de cada conjunto de proteína A se analizó a una A280-A230/coeficiente de extinción para la concentración. Los coeficientes de extinción eran 1,5 (mg/ml)-1 cm-1 para Trastuzumab y 2C4 humanizado, 1,46 (mg/ml)-1 cm-1 para el anticuerpo CD11a humanizado, 1,7 (mg/ml)-1 cm-1 para el anticuerpo de VEGF humanizado. Se calculó el rendimiento de cada ejecución. Si el rendimiento era de menos del 85 %, la ejecución se repitió. La lixiviación de la proteína A en cada conjunto se midió usando ELISA. Cada muestra se ensayó por triplicado en placas separadas para abarcar la mayor cantidad de variabilidad de ensayo y diluciones posibles.

ELISA: La anti-proteína A de pollo se recubre en una placa de microtitulación, de poliestireno, de 96 pocillos y se

incuba a 2-8 °C durante 12-72 horas. La placa se lava con un tampón de lavado de PBS/TWEEN 20™ y se añade un diluyente de ensayo que contiene NaCl/NaPO4/Gelatina de pescado/TWEEN 20™ a los pocillos de la placa para bloquear cualquier anticuerpo de la cubierta que no se ha unido. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Durante la incubación de la placa, la curva patrón de la proteína A se prepara a un intervalo de 0,39-50 ng/ml usando un diluyente de ensayo inyectado con 0,2 mg/ml de anticuerpo del producto homólogo al anticuerpo del producto contenido en las muestras. Las muestras se diluyen con diluyente de ensayo no inyectado a 0,2 mg/ml de anticuerpo del producto. Se usa un control de ensayo preparado del mismo anticuerpo del producto. Tras la incubación de 1-2 horas, la placa se lava con tampón de lavado para retirar el diluyente de ensayo. Después la curva patrón, el control de ensayo y las muestras se aplican en los pocillos de la placa, y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas donde la proteína A en los patrones, control y muestras se unirá al anticuerpo de recubrimiento. Tras la incubación de 2 horas, después se lava la placa con tampón de lavado para retirar cualquiera de los anticuerpos sin unir así como la matriz de la muestra. Después se aplica el anti-proteína A de pollo conjugada con HRP en los pocillos y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. El anti-proteína A de pollo conjugada con HRP se unirá a cualquier proteína A unida. Tras la incubación de 1 hora, la placa se lava de nuevo con tampón de lavado para retirar cualquiera de los anticuerpos sin unir. Después se añade la solución de sustrato, que consiste en comprimidos de o-fenilendiamida disueltos en H₂O₂ en solución salina con tampón fosfato (PBS), en los pocillos de la placa y se procesa mediante la enzima HRP, provocando que la solución del sustrato cambie de color. Una vez el color del sustrato ha alcanzado un intervalo de DO deseado, se detiene la reacción enzimática mediante la adición de ácido sulfúrico. La cantidad de proteína A unida se determina midiendo la densidad óptica a 490 nm usando un lector de placa de microtitulación.

Resultados y discusión

Varios anticuerpos se purificaron del FCCR mediante cromatografía de afinidad con proteína A en una PROSEP A™ o PROSEP vA™ a hasta 7 temperaturas a pequeña escala para caracterizar el efecto de la temperatura en la lixiviación de la proteína A. La lixiviación de la proteína A se afecta por la temperatura a diversos grados para los anticuerpos ensayados (Figura 1). La lixiviación de la proteína A durante la elución de los anticuerpos HER2, Trastuzumab y 2C4 humanizado, se afecta más significativamente, mientras que los anticuerpos VEGF humanizados y CD11a humanizados se afectaron solo ligeramente por la temperatura. Las pequeñas barras de error en relación con el orden de ejecución aleatorizado aseguran que el efecto de la temperatura en la lixiviación de la proteína A es real. Las líneas de tendencia en el gráfico representan un ajuste exponencial para cada conjunto de datos. Este tipo de correlación no lineal sería coherente con la fragmentación proteolítica activada por la temperatura.

Varios lotes de FCCR de Trastuzumab de ejecuciones en planta piloto de 400 l se ejecutaron en una PROSEP A™ a temperatura ambiente, para investigar el efecto de la variabilidad de lote a lote del FCCR en la lixiviación de la proteína A. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. Cada lote de HCFF se ejecutó en una PROSEP A™ por triplicado. Los lotes mostraron un intervalo de lixiviación de la proteína A de 4 a 13 ng/mg con una desviación típica pequeña de 0,2 a 1,1 ng/mg. Estos números son bajos en comparación con los resultados previos del ELISA de la proteína A usando Trastuzumab. La ejecución del control positivo en el ELISA en ese día también ejecutó bajo. Comparadas solo entre sí y no con muestras ensayadas en otros momentos, los resultados muestran alguna variabilidad en la lixiviación entre los lotes del FCCR de Trastuzumab.

Tabla 1: Variabilidad de lote a lote

Las ejecuciones se llevaron a cabo por triplicado en una resina PROSEP A™ rellena en una columna de 0,66 cm de diámetro por 20 cm de alto. La columna se equilibró y lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1, se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0, se eluyó con citrato 25 mM a pH 2,8, se regeneró con ácido fosfórico 0,1 M, y se almacenó en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 en 40 VC/h. El Trastuzumab de las ejecuciones en planta piloto de 400 l se ejecutó en una altura de lecho de 20 cm, cargado a 20 g de Trastuzumab/l de resina, se eluyó con citrato 25 mM a pH 2,8 y se agrupó a partir de 0,1 UA en 2 VC.

Lote del FCCR de Trastuzumab	Proteína A (ng/mg)
1	7 +/- 0,3
2	4 +/- 0,4
3	5 +/- 0,2
4	7 +/- 0,8
5	13 +/- 1,1
6	7 +/- 0,7

La Figura 2 compara el efecto de la temperatura en la lixiviación de la proteína A entre una PROSEP A™ y una PROSEP vA™ para 3 anticuerpos. Para el anticuerpo CD11a humanizado, los resultados en PROSEP A™ y PROSEP vA™ se superponen exactamente. En los casos del 2C4 humanizado y Trastuzumab, los resultados no se superponen, pero están dentro del intervalo esperado para la variabilidad de lote a lote de las resinas (Tabla 1), y los resultados probablemente no se deben a las diferencias entre la PROSEP A™ y PROSEP vA™. El efecto de la temperatura en la lixiviación de la proteína A de PROSEP A™ es equivalente a la de PROSEP vA™.

La secuencia del producto de mayor lixiviación mostrada en la Figura 1 puede haberse relacionado con inconsistencias en la ejecución de cada anticuerpo, debido a que se ejecutaron cada uno a sus condiciones de fabricación pre-determinadas. Debido a que las alturas de los lechos de resina y los tampones de elución no eran los mismos para cada anticuerpo ensayado inicialmente, también se estudió la posible dependencia de la altura del lecho y el tampón de elución. El 2C4 humanizado se ensayó previamente usando el tampón de elución de acetato, y los resultados se muestran en la Tabla 2. El 2C4 humanizado se ejecutó a escala de laboratorio a temperatura ambiente y a escala piloto a 15 °C. Dentro de la variabilidad entre las ejecuciones y el error en el ensayo, todas las condiciones produjeron resultados similares de proteína A lixiviada. El citrato y acetato tienen aproximadamente efectos equivalentes en la lixiviación de la proteína A. La altura del lecho era el otro contribuyente potencial a los mayores niveles de la lixiviación de la proteína A vistos con 2C4 humanizado y Trastuzumab en comparación con los otros anticuerpos ensayados. Cuando un lote de FCCR de Trastuzumab se ejecutó en tres alturas de lecho por triplicado, los resultados de proteína A lixiviada eran casi idénticos a los mostrados en la Tabla 2. La altura del lecho no parece afectar al nivel de lixiviación de la proteína A.

Tabla 2: Efecto de la altura del lecho en la lixiviación de la proteína A

Las ejecuciones se llevaron a cabo a 20 °C usando FCCR de Trastuzumab en una resina PROSEP vA™ rellena en una columna de 0,66 cm de diámetro por 20 cm de alto. La columna se equilibró y lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1, se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0 o 7,1, se eluyó con o bien citrato 25 mM a pH 2,8, o ácido acético 0,1 M a pH 2,9, se regeneró con ácido fosfórico 0,1 M, y se almacenó en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 en 40 VC/h. El título del FCCR de Trastuzumab en planta piloto de 400 l era de 0,7 mg/ml, y la columna se cargó a 20 g de Trastuzumab por litro de resina. El conjunto de elución se recogió a partir de 0,2 UA en 2 VC.	
Altura del lecho cm	Proteína A ng/mg
10	55 +/- 6
14	50 +/- 2
20	55 +/- 0

También se evaluó el efecto del tampón de elución en la lixiviación de la proteína A. El citrato y el acetato tienen efectos aproximadamente equivalentes en la lixiviación de la proteína A como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Efecto del tampón de elución en la proteína A lixiviada

La proteína A lixiviada que se muestra en partes por millón de anticuerpo humanizado 2C4 se ejecutó en una columna de altura de lecho de 20 cm, cargada a 14 g de anticuerpo 2C4 humanizado por litro de resina. La columna se equilibró y lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1, se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 7,1, se eluyó con ácido acético 0,1 M a pH 2,9, se regeneró con ácido fosfórico 0,1 M, y se almacenó en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0 en 40 VC/h. Algunas ejecuciones se eluyeron con citrato 25 mM a pH 2,8. El conjunto se recogió a partir 0,5 UA en un volumen conjunto de 2 VC. Las ejecuciones a escala de laboratorio se llevaron a cabo en una columna de 0,66 cm de diámetro y las ejecuciones a escala piloto se llevaron a cabo usando una columna de 10 cm de diámetro que contenía PROSEP A™. Se eluyeron dos ejecuciones con anticuerpo 2C4 humanizado con citrato y se eluyeron tres ejecuciones con anticuerpo 2C4 humanizado con acetato a escala piloto. Se llevaron a cabo tres ejecuciones con anticuerpo 2C4 humanizado con cada tampón de elución a escala de laboratorio.				
MAc	Escala	Temperatura °C	Proteína A del acetato (ng/mg)	Proteína A del citrato (ng/mg)
2C4 humanizado	laboratorio	temperatura ambiente	18 +/- 1	22 +/- 5
2C4 humanizado	piloto	15	10 +/- 2	15 +/- 6

La lixiviación de la proteína A con respecto a la temperatura para 2 lotes del FCCR de Trastuzumab a escala piloto (columna de 1,26 l) se muestra en la Figura 3. Se reprodujo la misma tendencia exponencial a escala piloto observada a pequeña escala. Las ejecuciones por duplicado a pequeña escala se llevaron a cabo usando los lotes del FCCR, que se usaron en la planta piloto. Los resultados de la planta piloto se alinean exactamente con los resultados a escala de laboratorio de las ejecuciones llevadas a cabo con el mismo lote de PROSEP vA™. El Trastuzumab a gran escala. El FCCR se refrigeró a 15 +/- 3 °C y se ejecutó en la resina PROSEP vA™. La Tabla 4 muestra el nivel de proteína A en los conjuntos de proteína A para 5 ejecuciones. En todas las ejecuciones el nivel de proteína A lixiviada era de 10 ng/ml o menos demostrándose que controlando la temperatura del FCCR se controla la lixiviación de la proteína A.

Tabla 4: Proteína A lixiviada en un proceso de 12.000 l en conjuntos de proteína A

El FCCR se refrigeró a 15 +/- 3 °C, la columna era de 100,5 l, 80 cm de diámetro por 20 cm de altura, y se eluyó con citrato. La temperatura se midió en el tanque del FCCR, entra la bomba y la columna, y a la salida de la columna. La columna se equilibró y lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1, se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, TMAC 0,5 M, EDTA 5 mM a pH 5,0, se eluyó con citrato 25 mM a pH 2,8, se regeneró con ácido fosfórico 0,1 M, y se almacenó en acetato de sodio 0,2 M, alcohol bencílico al 2 % a pH 5,0.		
Concentración de Trastuzumab (mg/ml)	Proteína A en el conjunto (ng/mg)	
0,69	8	7
0,69	7	10
0,67	10	8
0,72	8	7
0,68	7	

Conclusiones

- 5 La temperatura afecta a la lixiviación de la proteína A durante la cromatografía de afinidad con proteína A de los anticuerpos en diversos grados. Algunos anticuerpos se afectan más que otros; los anticuerpos HER2 Trastuzumab y 2C4 humanizado se afectaron enormemente. Todos los anticuerpos de lixiviación menores se ejecutaron en columnas de 14 cm de altura de lecho y se eluyeron con ácido acético 0,1 M, mientras que los de lixiviación mayores se ejecutaron en columnas de 20 cm de altura de lecho y se eluyeron usando ácido cítrico 25 mM. Se investigó la correlación de la altura del lecho y se encontró que no tenía influencia en la lixiviación de la proteína A. La elución con citrato o acetato tenía efectos esencialmente equivalentes en la lixiviación de la proteína A.

- 10 Controlando la temperatura del FCCR, el nivel de proteína A en el conjunto de proteína A puede controlarse, o reducirse. Un ensayo similar se llevó a cabo a escala piloto. Dos lotes del FCCR de Trastuzumab se ejecutaron en una columna PROSEP vA™ de 1,26 l a 5 temperaturas y se midió el nivel de proteína A en los conjuntos de elución. La lixiviación de la proteína A dependía de la temperatura de manera idéntica a la misma ejecución del FCCR a pequeña escala, y a los otros lotes de ejecución del HCFF a pequeña escala. A gran escala, el FCCR de Trastuzumab se refrigeró a 15 +/- 3 °C y la lixiviación de la proteína A se controló a menos de o igual a 10 ng/mg. Todos los anticuerpos se afectaron por la temperatura, pero a diversos grados. A todas las escalas, el control de la temperatura del FCCR durante la carga podría controlar la lixiviación de la proteína A. El aumento de la temperatura del FCCR tiene un efecto de aumento exponencial en la lixiviación de la proteína A.

Ejemplo 2**25 Inhibidores de proteasas para reducir la lixiviación de la proteína A****Durante la cromatografía de afinidad con proteína A**

- 30 La cromatografía de afinidad con proteína A puede usarse como una etapa inicial de captura en un proceso de recuperación para un anticuerpo, tal como un anticuerpo producido de manera recombinante por una célula de ovario de hámster chino (CHO). Esta etapa alcanza un alto grado de pureza mientras que mantiene un alto rendimiento. La lixiviación del ligando proteína A en el conjunto de elución es un inconveniente de esta etapa, que puede requerir etapas de cromatografía posteriores para retirar la proteína A lixiviada. Las resinas PROSEP A™ y PROSEP vA™ que pueden usarse para la cromatografía con proteína A, comprenden el ligando proteína A inmovilizado en un segmento principal de vidrio de poro controlado (VPC).

- 40 La proteína A puede lixiviarse del segmento principal de VPC a través de diversos mecanismos, incluyendo, pero sin limitación, rotura mecánica, exposición a pH bajo durante la fase de elución y/o actividad proteolítica. Como se muestra en el Ejemplo 1 anterior, se mostró que la lixiviación de la proteína A era dependiente de la temperatura durante la carga.

- 45 También se mostró que la lixiviación de la proteína A se inhibía parcialmente por el tratamiento del pH del fluido de cultivo celular recogido (FCCR). En particular, una incubación de 2 horas del FCCR a pH 3 redujo la lixiviación de aproximadamente 30 ppm a 4 ppm.

- 50 Las proteasas pueden organizarse en cuatro clase principales basándose en sus modos de acción. Estas son serina, cisteína, metalo- y aspártico proteasas. Se ensayaron los inhibidores que inhiben selectivamente estas clases en un intervalo de concentraciones (Tabla 5). Estos inhibidores se añadieron individualmente al FCCR de Trastuzumab, y el FCCR acondicionado se purificó a través de una resina PROSEP vA™ a una temperatura fijada de 25 °C. Si se observó una reducción de la proteína A lixiviada con un inhibidor específico, su efecto se re-examinó a 15 °C, una temperatura conocida para reducir la lixiviación. Esto permite un examen del efecto combinado de la temperatura y la concentración de inhibidor en la lixiviación de la proteína A. Se han ensayado los inhibidores descritos en la Tabla 5 a continuación, con la excepción de pepstatina.

Tabla 5: Inhibidores de las cuatro clases principales de proteasas

Inhibidor	Clase de proteasa	Inhibe	No inhibe	Concentración inicial recomendada
EDTA	Metalo-	Termolisina, etc.		N/D
PEFABLOC® SC	Serina	Tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreína plasmática y trombina.		0,4 – 4,0 mM
Aprotinina	Serina	Plasmina, calicreína, tripsina y quimotripsina.	Trombina o Factor X	0,01 – 0,3 mM
Leupeptina	Cisteína y serina con actividad similar a tripsina	Tripsina, papaína, plasmina y catepsina B.		1 mM
Pepestatina*	Aspártico	Pepsina, renina, catepsina D, quimosina y muchas proteasas ácidas microbianas.		1 mM

* La pepestatina no es soluble en soluciones acuosas; puede usarse en su lugar un inhibidor de la aspártico proteasa soluble en agua.

Resultados y discusión

- 5 Con el aumento de la concentración de EDTA, hubo un descenso en la lixiviación de la proteína A (Figura 8). Adicionalmente existió un efecto combinado de EDTA y temperatura en la inhibición de la lixiviación de la proteína A.

Con el aumento de la concentración de PEFABLOC®, hubo un descenso en la lixiviación de la proteína A (Figura 9). Este experimento se repetirá a 15 °C.

- 10 La aprotinina, otra serina proteasa, no tuvo un efecto en la lixiviación de la proteína A (Tabla 6). La leupeptina, un inhibidor de proteasa que puede inhibir tanto serina como cisteína proteasa, no tuvo un efecto en la lixiviación de la proteína A (Tabla 7).

15 **Tabla 6: Efecto de la aprotinina, un inhibidor de la serina proteasa, en la lixiviación de la proteína A**

Aprotinina (mg)	Aprotinina (uM)	Proteína A (ppm)	1 desviación estándar
0	0	37,4	5,2
14	12	35,6	0,1
28	25	31,1	0,4
54	47	34,53	0,0

Tabla 7: Efecto de la leupeptina, un inhibidor de la serina y cisteína proteasa, en la lixiviación de la proteína

A		
Leupeptina (mg)	Proteína A (ppm)	1 desviación estándar
0	37,4	5,2
0,15	32,9	0,7
0,3	32,4	1,5
0,6	34,4	1,1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de purificación de una proteína que comprende una región C_{H2}/C_{H3} mediante cromatografía de afinidad con proteína A, en el que una cromatografía con proteína A inicial se lleva a cabo a temperatura ambiente de más de 20 °C que da como resultado más de 20 ng de proteína A lixiviada por mg de proteína que está presente en una composición purificada, comprendiendo el método:
- 10 (a) someter una muestra de la proteína y una o más impurezas a una cromatografía de afinidad con proteína A, en donde la temperatura de la muestra está a una temperatura reducida en el intervalo de 3 °C a 15 °C,
(b) recuperar la composición purificada obtenida, y
(c) medir la proteína A lixiviada en dicha composición purificada,
- 15 en el que la lixiviación de la proteína A se reduce en la composición purificada obtenida a la temperatura reducida y dicha composición purificada contiene de 0 ng de proteína A a 15 ng de proteína A por mg de proteína.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la exposición de la composición sometida a cromatografía de afinidad con proteína A a un inhibidor de la proteasa.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que el inhibidor de la proteasa es EDTA o fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo clorhidrato (AEBSF).
4. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína es un anticuerpo.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en HER2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IgE, CD20, CD40, CD11a, factor tisular (FT), antígeno de células madre de próstata (PSCA), interleucina-8 (IL-8), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER3, HER4, $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 5\beta 3$.
- 30 6. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Trastuzumab, 2C4 humanizado, anticuerpo CD11a humanizado y anticuerpo de VEGF humanizado.
7. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se une al antígeno HER2.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es Trastuzumab o 2C4 humanizado.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína es una inmunoadhesina.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la inmunoadhesina es una inmunoadhesina del receptor del TNF.

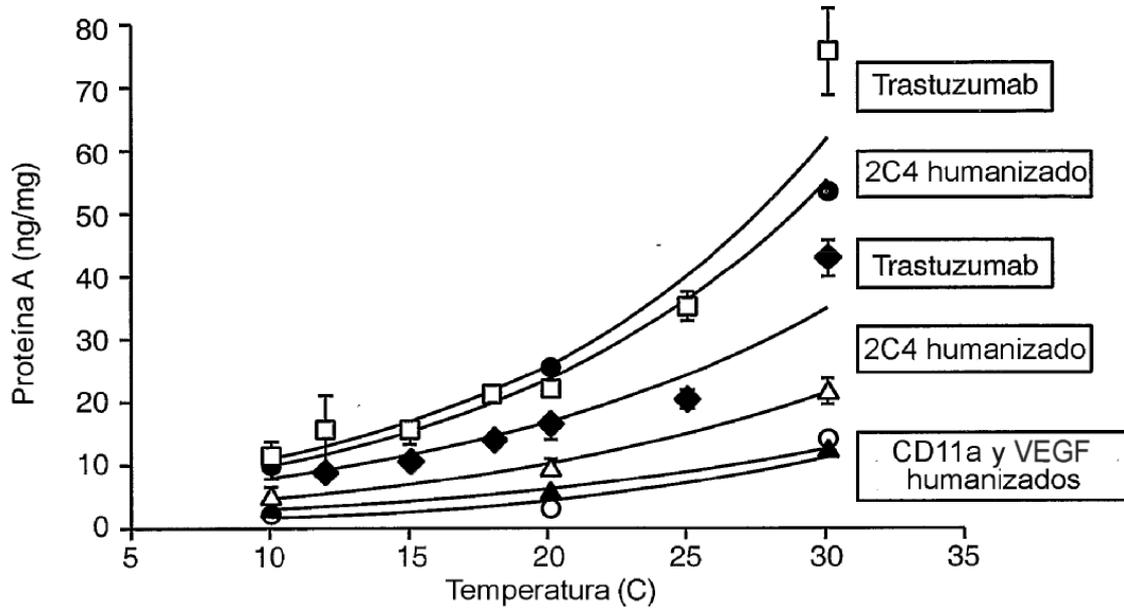


FIG. 1

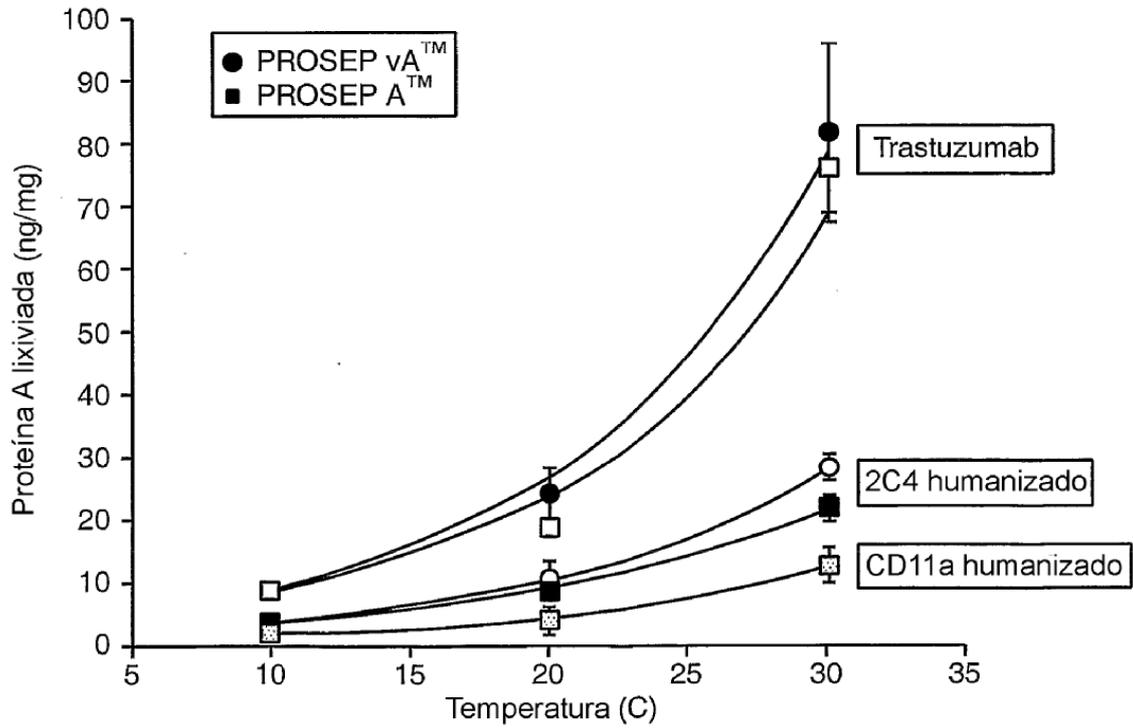


FIG. 2

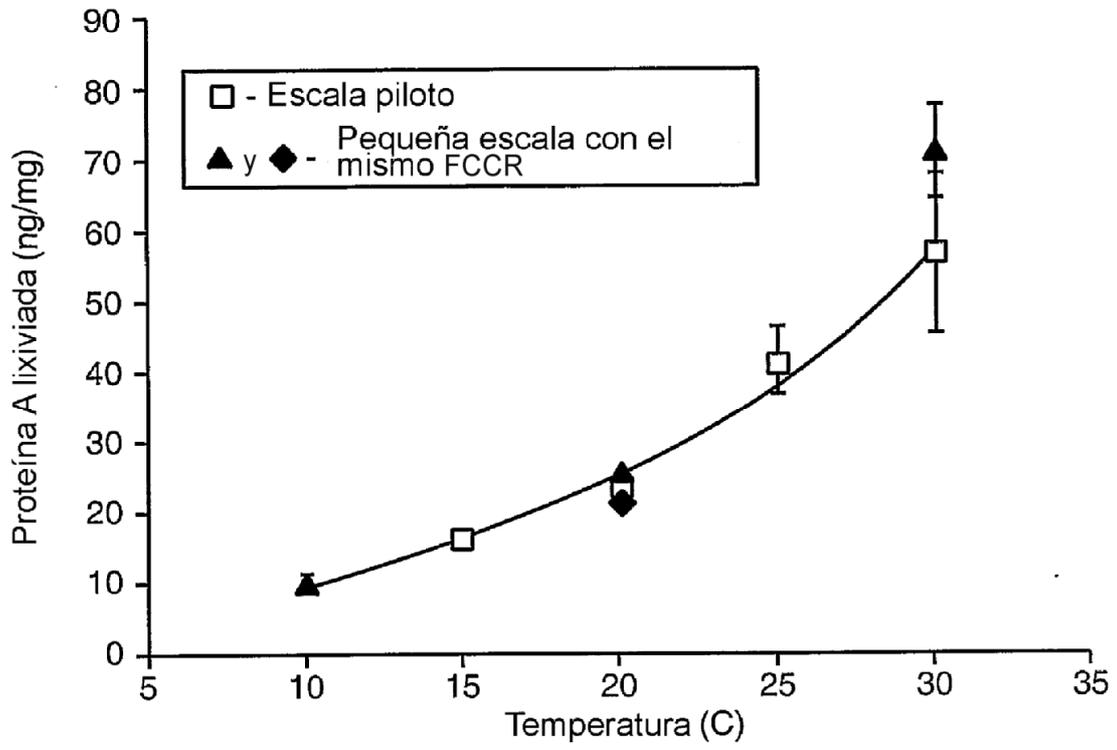


FIG. 3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAVYQQKPGKAPKLLIYSASYR
YTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK

FIG._5A

(SEQ ID NO: 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNP
SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
WGQGTLLVTVSS

FIG._5B

(SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTL
QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGQGTKVEIKR

FIG._6A

(SEQ ID NO: 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAPGKGLEWVGMIHPS
DSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIYFYGTTFYF
DYWGQGTLLVTVSS

FIG._6B

(SEQ ID NO: 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
HSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR

FIG._7A

(SEQ ID NO: 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY
TGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHW
YFDVWGQGTLLVTVSS

FIG._7B

(SEQ ID NO: 8)

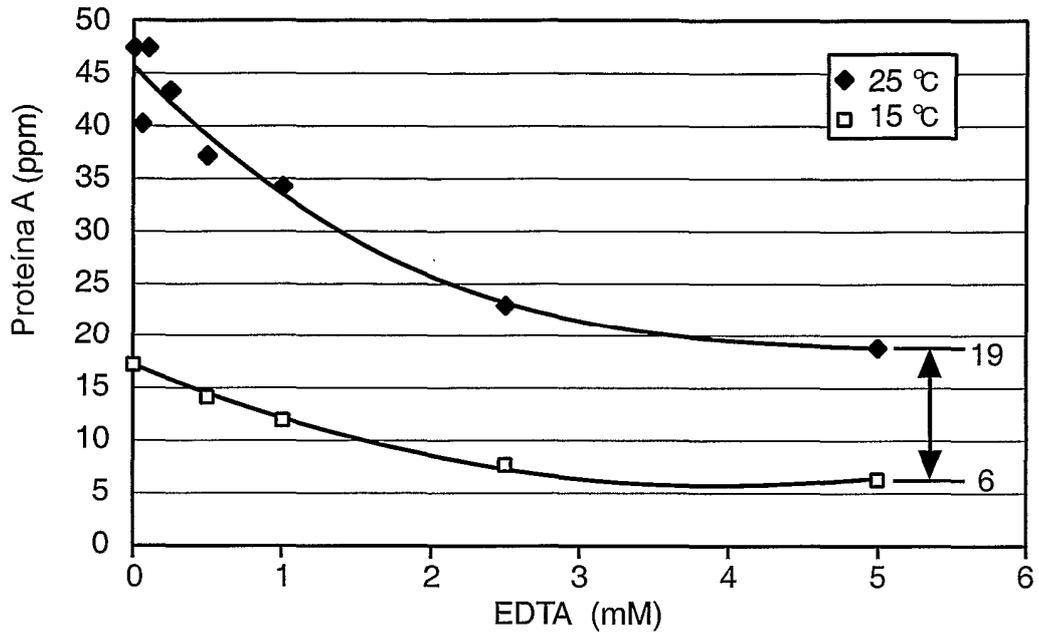


FIG. 8

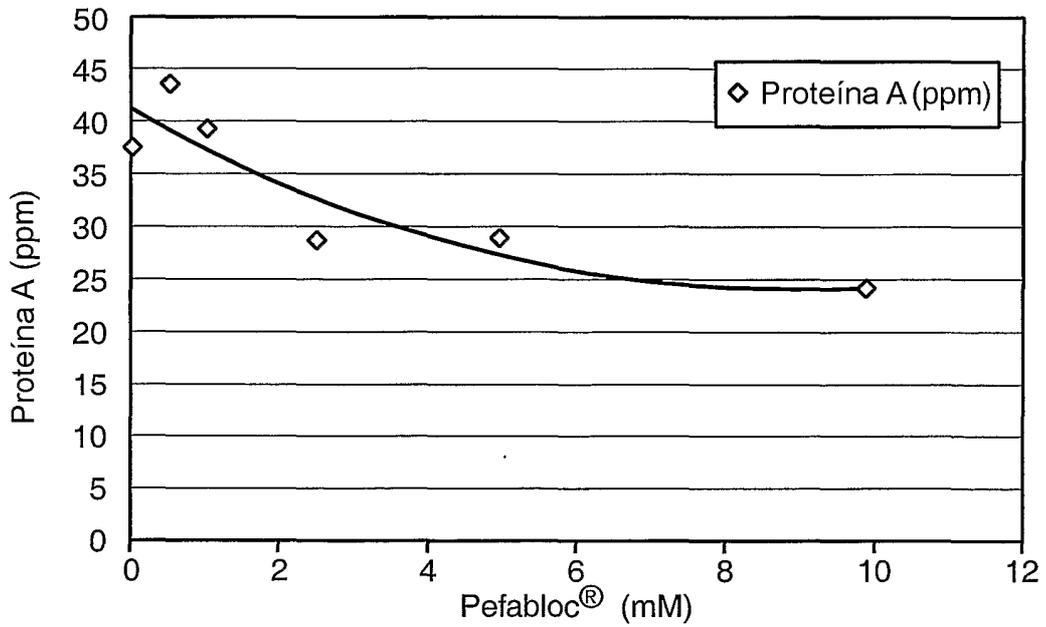


FIG. 9