

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 387**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2011 PCT/EP2011/051450**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11095506**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2011 E 11702974 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2531526**

54 Título: **Proceso para obtener anticuerpos**

30 Prioridad:

03.02.2010 GB 201001791

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

21.12.2017

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
60, Allée de la Recherche
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**BILGISCHER, JEAN-PASCAL PIERRE;
BASSETT, PHILIP JONATHAN;
PEARCE-HIGGINS, MARK ROBERT y
KENNY, ANDREW JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 387 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

Proceso para obtener anticuerpos

La presente invención se refiere a métodos para incrementar los rendimientos en la producción y el aislamiento de anticuerpos recombinantes y en particular anticuerpos terapéuticos. Los métodos son particularmente apropiados para la fabricación industrial en gran escala de anticuerpos terapéuticos.

Las técnicas de ADN recombinante se han desarrollado con rapidez y son particularmente útiles en la producción de anticuerpos, en particular anticuerpos terapéuticos. Los sistemas para la expresión de genes recombinantes son bien conocidos por los expertos en la técnica en el campo en cuestión. Incluyen la expresión en células de mamíferos, células de insectos, células fúngicas, células bacterianas y animales y plantas transgénicas. La elección del sistema de expresión depende de las características de la proteína codificada, por ejemplo, modificaciones postraduccionales. Otras consideraciones incluyen el tiempo y, en particular, el costo implicado en la producción de la cantidad deseada de material de la calidad requerida. Estas últimas consideraciones son particularmente importantes en la producción de anticuerpos terapéuticos de la calidad requerida para aprobación regulatoria y en las cantidades necesarias para el tratamiento de grandes cantidades de pacientes.

El sistema más ampliamente usado para la producción de proteínas recombinantes se basa en la expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*). Un problema específico hallado con el uso de *E. coli* es la dificultad en la producción de material de la calidad requerida en cantidades necesarias para terapia. En particular, el tiempo y los costos implicados pueden ser prohibitivos. Un problema específico de color es la pérdida incurrida en el campo de los anticuerpos durante la extracción de los anticuerpos de *E. coli*.

A pesar de que, proporcionalmente, los costos de purificación son una fracción del costo total de un producto de anticuerpos terapéuticos, la proporción de los costos de purificación se incrementará más cuando los costos de producción corriente arriba se vuelven más económicos. De esta manera, las mejoras en la recuperación y la purificación de anticuerpos disminuirá aún más los costos de producción independientemente de los medios de producción (Humphreys & Glover, Curr. Opin. Drug Discovery & Development, 2001, 4:172–185). Así, hay una necesidad de métodos que introducen ahorro de tiempo y/o de costos en la producción de anticuerpos terapéuticos y, en particular, en la purificación, por ejemplo, por aumento de la recuperación del producto y/o mejora de la calidad de la corriente de productos.

El bajo rendimiento de producto por fermentación o cultivo a menudo es un problema particular observado en la etapa de extracción primaria; la expresión del anticuerpo es alta dentro de las células, pero una recuperación en alto porcentaje en la etapa de extracción primaria es marcadamente difícil de lograr.

Un método que parcialmente aborda este último problema y que permite la producción de anticuerpos aceptables para uso terapéutico se describe en el documento US 5.655.866. Este método implica el uso del tratamiento térmico para facilitar el posterior aislamiento de fragmentos Fab' de anticuerpos funcionales de anticuerpos no funcionales, realizando el tratamiento térmico en cualquier momento durante la fermentación o cultivo o en cualquier etapa durante la extracción y purificación de los anticuerpos. A temperaturas elevadas, sobre temperatura ambiente, los anticuerpos funcionales son marcadamente estables, mientras que muchas otras proteínas que incluyen proteínas de células huésped y especies de cadena liviana y pesada libres y fragmentos de anticuerpos no funcionales forman precipitados y/o agregados que se separan con facilidad del anticuerpo funcional durante los procedimientos primarios de purificación tales como filtración o centrifugación o cromatografía en lecho fluidizado. Los extractos celulares se prepararon en el método descrito en el documento US 5.655.866 por incubación de las células intactas en tampón de Tris HCl 100 mM pH 7,4 con contenido de EDTA 10 mM. El documento US 5.665.866 también menciona que el pH se podría controlar o mantener a $7,0 \pm 0,05$ durante la fermentación de células huésped pero no menciona el control o el ajuste del pH después de la fermentación.

El documento WO 2006/054063 describe un incremento en el campo de los anticuerpos funcionales en la etapa de extracción primaria por inclusión de un tratamiento de no lisado en combinación con tratamiento térmico. Este método enseña que, después de la centrifugación, los pellets celulares se resuspendieron en una muestra que comprendía 1 M de Tris, pH 7,4 con 100 mM de EDTA, seguido por tratamiento de no lisado y luego tratamiento térmico.

El documento WO 2005/019466 describe un incremento en el campo de las proteínas recombinantes por inclusión de una etapa de interrupción en condiciones definidas de temperatura y pH después de la fermentación, pero antes del procesamiento corriente abajo, incluyendo extracción.

Compendio de la invención

La presente invención descrita en la presente se basa en la sorprendente e inesperada observación de que, después de haber cultivado una muestra de células huésped transformadas con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante, un incremento en el pH de la muestra resultante durante el proceso de recuperación primario tiene un significativo impacto beneficioso en el rendimiento de los anticuerpos.

Mientras que el anticuerpo puede iniciar en un pH en el intervalo de 6 – 9 antes del procesamiento, como

calentamiento, sorprendentemente incluso cuando se tampona, el pH cae, probablemente como resultado del metabolismo celular. Los presentes inventores creen ahora que esto es perjudicial para el rendimiento / la recuperación y propusieron abordar este tema, de ser apropiado, ajustando el pH del material antes y/o durante el procesamiento para asegurar que el pH queda dentro del intervalo diana.

- 5 Sorprendentemente, se halló que el pH de la muestra anterior a una etapa de tratamiento térmico tiene un efecto considerable sobre el rendimiento del anticuerpo de la muestra celular. Se halló que, ajustando el pH de la muestra, de modo tal que el pH de la muestra fuera de pH 6 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico, se proporciona un incremento en el rendimiento del anticuerpo de hasta el 40%. Esto permite ahorros ampliamente beneficiosos en tiempo y costos de producción de cantidades de anticuerpos funcionales de calidad terapéutica. De hecho, otras etapas a menudo usadas para incrementar el rendimiento, como etapas de homogeneización y mantenimiento, pueden ya no requerir lograr altos niveles de rendimiento de anticuerpo.

- 10 En métodos usados previamente, por ejemplo, en el documento US 5.655.866, se prepararon extractos celulares al incubar las células intactas en un tampón que tiene un pH de 7,4. Se halló que, a pesar de la adición de un tampón del que se esperaba que mantuviera el pH de la muestra a un nivel constante, el pH de la muestra celular de hecho se reduce con el paso del tiempo. En ciertas circunstancias, como durante largos períodos de tiempo después de la adición de un tampón, el pH de la muestra se halló bajo a pH 5,5 antes de la etapa de tratamiento térmico. Se halló que la detección y opcionalmente el ajuste del pH antes del tratamiento térmico para asegurar que el pH de la muestra es de 6 a 9 da como resultado un sorprendente incremento en el rendimiento del anticuerpo.

- 20 Si bien no se desea quedar ligados por la teoría, se cree que es importante mantener el pH en el intervalo de 6 a 9 durante la etapa de procesamiento, como tratamiento térmico. El ajuste del pH antes del procesamiento (como una etapa de tratamiento térmico) ayuda a mantener el pH en el intervalo correcto. Por ende, en un aspecto, se proporciona una etapa de extracción de anticuerpos, en donde el pH se mantiene sustancialmente en el intervalo de 6 a 9, sustancialmente durante el proceso.

- 25 Sin quedar ligados por la teoría, se cree que los métodos proporcionados por la presente invención permiten la recuperación de proteína recombinante del periplasma durante el aislamiento primario que no se libera en condiciones de extracción estándar.

- 30 Por consiguiente, se revela en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprenden el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; adición de un tampón de extracción a la muestra; y sometimiento de la muestra a una etapa de tratamiento térmico; en donde el pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción y opcionalmente se ajusta, para asegurar que el pH de la muestra sea de 6 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico.

El control del pH en esta etapa es esencial para establecer el control sobre el pH.

- 35 En un aspecto alternativo, se revela en la presente un método para la extracción de moléculas de anticuerpos recombinantes de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; que comprende las etapas de:

ajustar el pH de una composición de dichas células para estar en el intervalo de 6 a 9, de modo tal que el pH se mantenga en el intervalo durante una posterior etapa de extracción,

someter las células a una etapa de extracción, como una etapa de tratamiento térmico,

- 40 en donde el pH se controla al menos en un punto temporal inmediatamente antes y/o durante la etapa de extracción.

También se halló que un incremento en el pH del tampón de extracción proporciona un aumento sorprendente en el rendimiento del anticuerpo después de que la muestra se someta a una etapa de tratamiento térmico.

- 45 Por consiguiente, en un segundo aspecto, se revela en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende cultivar una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; añadir un tampón de extracción a la muestra que tiene un pH de 7,5 a 9,0; y someter la muestra a una etapa de tratamiento térmico.

Descripción detallada de la invención

- 50 La molécula de anticuerpo como se emplea en la presente pretende referirse a un anticuerpo entero o su fragmento de unión, en particular un anticuerpo entero o un fragmento Fab. Las moléculas de anticuerpo en las realizaciones de la invención pretenden referirse a un Fab, Fab modificado, un Fab de bisagra alterado, Fab', F(ab')₂ o fragmentos Fv; un anticuerpo de cadena simple; un Fv de cadena simple, en donde los dominios variables de cadena pesada y liviana se unen por medio de un ligador de péptidos y un anticuerpo de especificidad dual como un Fab-dAb.

En el primer aspecto de la presente invención, la muestra tiene o se ajusta para tener un pH de 7 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico.

En una realización preferida, la muestra tiene un pH o pH, 7,0 a 9,0, pH de 7,0 a 8,5, pH de 7,0 a 8,0, pH de 7,1 a 8,0, pH de 7,5 a 8,0, pH de 7,0 a 7,8, pH de 7,1 a 7,8, pH de 7,1 a 7,7, pH de 7,2 a 7,6, pH de 7,3 a 7,5, pH de 7,1, pH de 7,2, pH de 7,3, pH de 7,4, pH de 7,5, pH de 7,6, pH de 7,7, pH de 7,8 o pH de 7,9, como pH 7,4, en particular pH de 6,8 antes de la etapa de tratamiento térmico.

5 La medición del pH mencionada en la presente se normaliza en general hasta 20 grados C.

La etapa de tratamiento térmico en el método de la presente invención es una etapa de mantenimiento de la temperatura de la muestra a una temperatura elevada deseada una vez que esta temperatura elevada deseada se haya alcanzado durante una fase de calentamiento. Los intervalos de temperatura apropiados para la etapa de tratamiento térmico van de 40 a 70 °C.

10 En el contexto de la presente invención, la fase "antes de la etapa de tratamiento térmico" significa antes y que incluye el punto temporal en que la muestra alcanza la temperatura elevada deseada y la etapa de tratamiento térmico (mantenimiento a una temperatura elevada) comienza. A fin de alcanzar la temperatura elevada deseada durante la etapa de tratamiento térmico, la muestra se somete a una "fase de calentamiento" durante la cual la temperatura de la muestra se eleva hasta la temperatura elevada deseada. En una realización, el método de acuerdo con la presente
15 invención comprende someter la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento térmico.

En el método de la presente invención, la muestra tiene un pH de 7 a 9, antes de la etapa de tratamiento térmico. En este contexto, "antes de la etapa de tratamiento térmico" significa que el pH de la muestra esté en el nivel requerido antes o en el momento en el que la muestra alcanza la temperatura elevada deseada durante la etapa de tratamiento
20 térmico. En la realización en la que el método comprende someter la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento térmico, la muestra puede estar en el nivel de pH requerido antes del inicio de la fase de calentamiento y/o en el nivel de pH requerido durante la fase de calentamiento.

En una realización, la presente invención proporciona un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; adición de un tampón de extracción a la muestra; y
25 sometimiento de la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento térmico; en donde el pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción y opcionalmente se ajusta para asegurar que el pH de la muestra sea de pH 7 a 9, por ejemplo, como de pH 7 a 8, antes de la fase de calentamiento.

En una realización alternativa, la presente invención proporciona un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; adición de un tampón de extracción a la muestra; y
30 sometimiento de la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento térmico; en donde el pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción.

En una realización, el pH de la muestra se detecta y opcionalmente se ajusta para asegurar que el pH de la muestra esté en un primer pH antes de la fase de calentamiento y en un segundo pH durante la fase de calentamiento. El primer y el segundo nivel del pH son preferiblemente diferentes. Con preferencia, el segundo pH es inferior al primer pH. Por
35 consiguiente, la presente invención proporciona un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; adición de un tampón de extracción a la muestra; y sometimiento de la muestra a una fase de calentamiento y una etapa de tratamiento térmico; en donde el pH de la
40 muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción y opcionalmente se ajusta para asegurar que el pH de la muestra sea de pH 7 a 9, preferiblemente de pH 7 a 8, antes de la fase de calentamiento. En esta realización, el pH de la muestra se puede detectar y opcionalmente ajustar antes de la fase de calentamiento y detectar y opcionalmente ajustar durante la fase de calentamiento.

En una realización preferida, la muestra tiene un pH de pH 7 a 9, más preferiblemente, de pH 7 a 8, inmediatamente antes de la fase de calentamiento. También se revela un método en el que la muestra tiene un pH de 6 a 9, preferiblemente un pH de 6 a 8, más preferiblemente, un pH de 6 a 7 inmediatamente antes de la etapa de tratamiento
45 térmico durante la fase de calentamiento, que opcionalmente incluye el punto en que la muestra alcanza la temperatura elevada deseada y la etapa de tratamiento térmico comienza. Se halló que el pH de la muestra inmediatamente antes de la fase de calentamiento o inmediatamente antes de la etapa de tratamiento térmico tiene un impacto significativo sobre el rendimiento del anticuerpo recombinante.
50

En el contexto de la presente invención, la frase "inmediatamente antes de" significa preferiblemente durante un período de 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos, 1 minuto o menos, 30 segundos o menos, 10 segundos o
menos, 5 segundos o menos, 1 segundo o menos antes de la fase de calentamiento o la etapa de tratamiento térmico.

55 El pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción. El pH de la muestra se puede detectar usando cualquier equipo apropiado de medición de pH conocido en la técnica. El pH de la muestra se puede detectar en uno o varios puntos separados durante el método, como en el momento de la adición del tampón de extracción, inmediatamente después de la adición del tampón de extracción, inmediatamente antes de iniciar la fase de

- calentamiento, en el momento de iniciar la fase de calentamiento, durante la fase de calentamiento incluyendo el punto en el que la muestra alcanza la temperatura elevada deseada durante la etapa de tratamiento térmico, durante la etapa de tratamiento térmico y después de la etapa de tratamiento térmico. De modo alternativo, el pH de la muestra se detecta por control continuo. En esta realización en la que el pH de la muestra se controla de modo continuo, el pH se controla preferiblemente de modo continuo después de la etapa de cultivo de las células, preferiblemente después de una etapa de centrifugación después de cultivo, hasta el inicio de la etapa de tratamiento térmico. En una realización preferida, el pH de la muestra se controla de modo continuo a partir del momento de la adición del tampón de extracción hasta el inicio de la etapa de tratamiento térmico. Sin embargo, el pH también se puede controlar durante la etapa de cultivo y/o durante la etapa de tratamiento térmico.
- De esta manera, en una realización, se controla el perfil del pH de la etapa de calentamiento.
- En una realización preferida, el pH de la muestra se detecta y opcionalmente se ajusta y la fase de calentamiento se inicia, preferiblemente de modo automático, cuando la muestra alcanza el pH deseado.
- El tampón de extracción se añade después de la etapa de cultivo de la muestra celular. Si el método comprende una etapa de centrifugación después de la etapa de cultivo, el tampón de extracción se puede añadir antes y/o durante y/o después de la etapa de centrifugación. Con preferencia, el tampón de extracción se añade después de una etapa de centrifugación para resuspender el pellet celular resultante de la centrifugación.
- En una realización de la presente invención, el tampón de extracción tiene un pH apropiado que asegura que el pH de la muestra es de pH 7 a 9, antes de la etapa de tratamiento térmico. En esta realización, en la que tampón de extracción tiene un pH apropiado para asegurar que el pH de la muestra es de 7 a 9, antes del tratamiento térmico, el tampón de extracción tiene, por ejemplo, un pH de 7,5 a 9,0, pH de 7,5 a 8,8, pH de 7,5 a 8,5, pH de 8,0 a 9,0, pH de 8,5 a 9,0, pH de 8,6 a 8,9, pH de 8,0, pH de 8,1, pH de 8,2, pH de 8,3, pH de 8,4, pH de 8,5, pH de 8,6, pH de 8,7, pH de 8,8, pH de 8,9 o pH de 9,0. La fase de calentamiento y la etapa de tratamiento térmico se llevan a cabo preferiblemente poco después, preferiblemente inmediatamente después de la adición del tampón de extracción a fin de asegurar que la muestra tiene el pH requerido antes de la etapa de tratamiento térmico. Por ejemplo, la fase de calentamiento o la etapa de tratamiento térmico se puede llevar a cabo 4 horas o menos, 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 30 minutos o menos, 10 minutos o menos o 5 minutos o menos después de la adición del tampón de extracción.
- Por consiguiente, el método de la presente invención puede no requerir una etapa de ajuste del pH de la muestra. El pH de la muestra se puede detectar después de la adición del tampón de extracción para que sea pH de 7 a 9 según se requiere. Este puede ser por ejemplo el caso si el pH del tampón de extracción es apropiado para llevar el pH de la muestra de 7 a 9 según se describió con anterioridad, por ejemplo, en donde el tampón de extracción tiene un pH de 7,5 a 9,0 y la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo brevemente después.
- Normalmente, sin embargo, debido a la duración entre la adición del tampón de extracción y la etapa de tratamiento térmico, el método de acuerdo con la presente invención requiere una etapa de detección y ajuste del pH de la muestra, además de cualquier ajuste del pH que se puede causar por adición del tampón de extracción, para asegurar que el pH de la muestra sea de 7 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico.
- En esta realización, en la que el método comprende una etapa de detección y ajuste del pH, el pH del tampón de extracción puede ser inferior a pH 8.
- De modo alternativo, en una realización preferida, el tampón de extracción tiene un pH de 7,5 a 9,0, pH 7,5 a 8,8, pH 7,5 a 8,5, pH 8,0 a 9,0, pH 8,5 a 9,0, pH 8,6 a 8,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, más preferiblemente pH 8,0.
- En esta realización, el pH de la muestra se puede ajustar por cualquier medio apropiado y en cualquier momento apropiado durante el método. El pH de la muestra se puede ajustar antes y/o después de la adición del tampón de extracción.
- En una realización, el pH de la muestra se ajusta antes de la adición del tampón de extracción. En esta realización, si el método comprende una etapa de centrifugación después de la etapa de cultivo, la etapa de ajuste del pH se puede llevar a cabo antes y/o después de la etapa de centrifugación. El pH de la muestra después de cultivar las células y opcionalmente después de la centrifugación, normalmente es bajo. Por ejemplo, la muestra puede tener un pH de aproximadamente pH 5,5. Por consiguiente, después de cultivar las células y opcionalmente después de una o varias etapas adicionales, como centrifugación, el pH de la muestra se puede ajustar. Por ejemplo, el pH de la muestra se puede ajustar antes de la adición del tampón de extracción a pH 6,5 a 8,0, preferiblemente pH de 7,0 a 8,0, pH de 6,5 a 7,5, pH de 6,6 a 7,4, pH de 6,7 a 7,3, pH de 6,8 a 7,2, pH de 6,9 a 7,1, más preferiblemente, pH de 6,9.
- En una realización, en la que el pH de la muestra antes de la adición del tampón de extracción es inferior a pH 7, como pH 6,9 y se requiere que el pH de la muestra antes de la etapa de tratamiento térmico sea pH de 7 a 9, el pH de la muestra requiere mayor elevación por adición del tampón de extracción y/o por otro ajuste del pH después de la adición del tampón de extracción de modo que el pH de la muestra sea de 7 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico.

- 5 En una realización preferida de la presente invención, el pH de la muestra se ajusta a pH 7 a 9 después de la adición del tampón de extracción pero antes de la etapa de tratamiento térmico. En esta etapa, la muestra se ajusta preferiblemente a pH 7,0 a 9,0, pH 7,0 a 8,5, pH 7,0 a 8,0, pH 7,1 a 8,0, pH 7,5 a 8,0, pH 7,0 a 7,8, pH 7,1 a 7,8, pH 7,1 a 7,7, pH 7,2 a 7,6, pH 7,3 a 7,5, pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8 ó 7,9 y más preferiblemente, pH 7,4. En una realización, el pH de la muestra se ajusta antes de la fase de calentamiento. Con preferencia, el pH de la muestra se ajusta a pH 7 a 9, preferiblemente pH 7 a 8, antes de la fase de calentamiento. De modo alternativo o adicional, el pH de la muestra se ajusta durante la fase de calentamiento. Con preferencia, el pH de la muestra se ajusta a pH 6 a 8, preferiblemente pH 6 a 7 durante la fase de calentamiento.
- 10 En una realización preferida de la presente invención, un tampón de extracción que tiene un pH de 8 se añade a la muestra y el pH de la muestra se detecta y luego se ajusta a un pH de 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico, preferiblemente antes de la fase de calentamiento, más preferiblemente, inmediatamente antes de la fase de calentamiento.
- 15 En la realización en la que el pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción y se ajusta antes de la etapa de tratamiento térmico, el pH de la muestra se puede detectar y ajustar antes del inicio de la fase de calentamiento. Adicional o alternativamente, el pH de la muestra se puede detectar y ajustar durante la fase de calentamiento.
- 20 En una realización preferida, el pH de la muestra se detecta y se ajusta inmediatamente antes de la fase de calentamiento. Adicional o alternativamente, el pH de la muestra se detecta y se ajusta inmediatamente antes de la etapa de tratamiento térmico durante la fase de calentamiento, que opcionalmente incluye el punto en el que la muestra alcanzó la temperatura elevada deseada y la etapa de tratamiento térmico comienza.
- 25 En el contexto de la presente invención, la expresión "inmediatamente antes de" significa preferiblemente que el pH de la muestra se detecta y se ajusta a pH 7 a 9 durante 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos, 1 minuto o menos, 30 segundos o menos, 10 segundos o menos, 5 segundos o menos, 1 segundo o menos antes de la fase de calentamiento o antes de la etapa de tratamiento térmico. La expresión "inmediatamente antes de" también puede comprender el pH de la solución detectada y se ajusta al inicio de la fase de calentamiento o al inicio de la etapa de tratamiento térmico. En una realización preferida, se dispara la fase de calentamiento y/o la etapa de tratamiento térmico, preferiblemente en forma automática cuando se detecta que el pH de la muestra es de pH 6 a 9.
- 30 El pH de la muestra se puede detectar y ajustar por cualquier etapa simple o múltiple de ajuste del pH como se describió con anterioridad. Por consiguiente, el pH se puede ajustar:
- sólo antes de la adición del tampón de extracción;
 - sólo después de la adición del tampón de extracción pero antes de la etapa de tratamiento térmico; o
 - antes de la adición del tampón de extracción y después de la adición del tampón de extracción pero antes de la etapa de tratamiento térmico.
- 35 El pH se puede ajustar varias veces después de la adición de tampón de extracción, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más veces. En una realización, el pH de la muestra se ajusta de modo continuo, preferiblemente entre la adición del tampón de extracción y antes de la etapa de tratamiento térmico.
- 40 El pH de la muestra se puede detectar en una realización en forma adicional y opcionalmente se puede ajustar durante la etapa de tratamiento térmico. Por consiguiente, el método de acuerdo con la presente invención también puede incluir una etapa de ajuste del pH de la muestra durante la etapa de tratamiento térmico. El pH de la muestra se ajusta preferiblemente durante la etapa de tratamiento térmico a pH 6,0 a 9,0, pH 6,5 a 8,5, pH 6,5 a 8,0, pH 7,0 a 9,0, pH 7,0 a 8,5, pH 7,0 a 8,0, pH 7,1 a 8,0, pH 7,5 a 8,0, pH 7,0 a 7,8, pH 7,1 a 7,8, pH 7,1 a 7,7, pH 7,2 a 7,6, pH 7,3 a 7,5, pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8 ó 7,9.
- 45 En el segundo aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante; adición de un tampón de extracción a la muestra que tiene un pH de 7,5 a 9,0; y sometimiento de la muestra a una etapa de tratamiento térmico.
- 50 Como se describió con anterioridad, en el primer aspecto de la presente invención, el tampón de extracción preferiblemente tiene un pH de 7,5 a 9,0, pH 7,5 a 8,8, pH 7,5 a 8,5, pH 8,0 a 9,0, pH 8,5 a 9,0, pH 8,6 a 8,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9 o pH 9,0. En este aspecto de la presente invención, no es esencial detectar el pH de la muestra. El método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede comprender la detección del pH de la muestra y el ajuste del pH de la muestra tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención. Sin embargo, no es esencial incluir una etapa de detección del pH o de ajuste del pH. En una realización, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención no incluye una etapa de detección
- 55 del pH de la muestra o una etapa de ajuste del pH.

La siguiente descripción detallada de la invención se aplica a realizaciones tanto del primer como del segundo aspecto de la presente invención.

Agente de ajuste del pH y tampón de extracción

5 El ajuste del pH debe ser tal que el pH se sostenga / se mantenga en el intervalo deseado de pH 6–9 durante la etapa de tratamiento térmico.

En una realización, el pH se ajusta con una base como una base inorgánica, por ejemplo, hidróxido de sodio o una base orgánica tales como trietilamina o trimetilamina.

10 Se puede usar cualquier agente apropiado para ajustar el pH de la muestra. El agente puede ser el tampón de extracción o se puede añadir antes y/o después del tampón de extracción. Los agentes normales que se pueden usar para ajustar el pH comprende o consiste en uno o varios de los siguientes: NaOH, NH₄OH, ácido sulfúrico, EDTA, tampón Tris. Con preferencia, el pH de la muestra se ajusta usando una base como hidróxido de sodio o hidróxido de amonio.

15 En una realización, el tampón de extracción es un tampón de Tris(hidroximetil)aminometano / sal disódica deshidratada de ácido etilendinitrilotetraacético (Tris / EDTA) normalmente ajustado a un pH deseado por adición de HCl. Sin quedar ligado por ninguna teoría, se cree que Tris y EDTA trabajan sinérgicamente en la liberación de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana exterior de *E. coli*. EDTA remueve los cationes divalentes que estabilizan el LPS de la membrana exterior. Se cree que Tris se une con LPS y reemplaza Ca²⁺ y Mg²⁺. Esto da como resultado una reducción de las interacciones entre las moléculas de LPS y, de este modo, mayor permeabilidad de la membrana exterior (Vaara, M. 1992. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. American Society for
20 Microbiology 56:395–411).

Etapa de tratamiento térmico

25 La etapa de tratamiento térmico en el método de la presente invención es preferiblemente como se describe en detalle en el documento US 5.665.866. La etapa de tratamiento térmico hace posible obtener una muestra de anticuerpo soluble, correctamente plegado y ensamblado facilitando la remoción de otro material relacionado con anticuerpos. El anticuerpo que está "correctamente plegado y ensamblado" se muestra por la presencia de una banda simple correspondiente al peso molecular esperado para cadenas pesadas y livianas ensambladas en SDS PAGE no reductor. Otro material relacionado con anticuerpos será normalmente una cadena pesada y liviana libre o una parte de ella, fragmentos parcialmente degradados de anticuerpo correctamente plegado y ensamblado.

30 La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo sometiendo la muestra a una temperatura elevada deseada. Más preferiblemente, la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo dentro del intervalo de 40 °C a 70 °C. La temperatura se puede seleccionar según se desee y puede depender de la estabilidad del anticuerpo para purificación. En otra realización, la temperatura está dentro del intervalo de 40 °C a 65 °C o preferiblemente dentro del intervalo 40 °C a 60 °C, más preferiblemente, dentro del intervalo 45 °C a 60 °C, más preferiblemente aún, dentro del intervalo 50 °C a 60 °C y más preferiblemente, de 55 °C a 60 °C, de 58 °C a 60 °C o 59 °C. De esta manera, las temperaturas mínimas son
35 de 40 °C y las temperaturas máximas son de 60 °C, 65 °C o 70 °C.

40 La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente durante un período de tiempo prolongado. La duración del tratamiento térmico está preferiblemente entre 1 y 24 horas, más preferiblemente, entre 4 y 18 horas, incluso más preferiblemente, entre 6 y 16 horas y más preferiblemente, entre 10 y 14 horas o entre 10 y 12 horas, por ejemplo, 12 horas. De esta manera, el tiempo mínimo para el tratamiento térmico es de 1, 2 ó 3 horas y el máximo es de 20, 22 ó 24 horas.

En una realización particular, el tratamiento térmico se lleva a cabo a 50 °C a 60 °C durante 10 a 16 horas y más preferiblemente, a 59 °C durante 10 a 12 horas. Un experto en la técnica comprenderá que las temperaturas y el tiempo se pueden seleccionar para que sea adecuado para la muestra en cuestión y las características del anticuerpo que se produce.

45 En una realización, el proceso de acuerdo con la presente revelación no incluye una etapa de pretratamiento de mantenimiento de células en condiciones controladas antes de realizar la etapa de tratamiento térmico.

50 En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende el cultivo de una muestra de células huésped transformada con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante y adición de un tampón de extracción a la muestra y sometimiento de la muestra a una etapa de tratamiento térmico dentro del intervalo de 40 °C a 70 °C, preferiblemente 59 °C, durante un período de hasta 15 horas, preferiblemente de 10–12 horas, en donde antes de la etapa de tratamiento térmico, se controla el pH de la muestra y se ajusta de modo tal que el pH de la muestra sea de pH 7 a 8, preferiblemente de pH 7,4, antes de la etapa de tratamiento térmico, con preferencia, inmediatamente antes de la fase de calentamiento. Con preferencia, un tampón de extracción que tiene un pH de 7,4 u 8,0 se añade a la muestra.

55 La etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente en un agitador establecido a una RPM apropiada,

como 200 RPM. Sin embargo, la RPM apropiada variará según la escala del método.

Fermentación

5 La etapa de cultivo de una muestra de células huésped puede comprender la fermentación en cualquier escala deseada. En los métodos de la invención, una muestra puede ser el producto de una fermentación que comprende bacterias, en especial bacterias gram-negativas. Más preferiblemente, la muestra es el producto de una fermentación que comprende *E. coli* que expresa un anticuerpo recombinante, en donde dichos anticuerpos producidos pueden ser una mezcla mixture de anticuerpos funcionales y no funcionales. Si se desea, las células huésped se pueden someter a una colección del medio de fermentación, por ejemplo, células huésped se pueden coleccionar de la muestra por centrifugación, filtración o concentración. En particular, los métodos de la invención son apropiados para la producción industrial en gran escala de anticuerpos de calidad terapéutica.

Otras etapas

También se revela un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende una o varias otras etapas.

15 Se revela en la presente temperatura ambiente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende una etapa de centrifugación después de la etapa de cultivo, seguido por suspensión de las células por adición del tampón de extracción.

20 El método puede comprender adicionalmente procedimientos de purificación primarios tales como filtración y/o centrifugación. También se incluye la cromatografía en lecho fluidizado. Los procedimientos de purificación corriente abajo preferidos incluyen cromatografía de intercambio iónico, microfiltración, ultrafiltración, diafiltración y captura en lecho fijo y captura en lecho expandido y combinaciones de cualquiera de ellos.

Etapas de tratamiento de no lisis

25 El método también puede comprender someter la muestra a una etapa de tratamiento de no lisis antes de someter la muestra a la etapa de tratamiento térmico. Esta etapa también se puede referir a una etapa de homogeneización (etapa homog.). La etapa de tratamiento de no lisis puede incrementar también el rendimiento de anticuerpos funcionales aislados u obtenidos y facilidad de manipulación de la muestra en una gran escala. La lisis causa un incremento en la viscosidad que puede causar problemas en el procesamiento corriente abajo y la purificación de anticuerpos funcionales. En particular, la lisis de células huésped causa la liberación de proteínas de células huésped que vuelven más costosa la purificación y consume más tiempo, ya que se pueden requerir más etapas de purificación y/o mayores cantidades de materiales de cromatografía se necesitarán para lograr la pureza requerida. La liberación sustancial del ADN de células huésped aumenta la viscosidad de la muestra que causa dificultades de filtración y centrifugación que es una causa principal de pérdida de proteínas durante la clarificación. Una muestra lisada (es decir, que contiene proteínas de células huésped y ADN) también puede causar el bloqueo de los materiales cromatográficos. La etapa de tratamiento de no lisis se lleva a cabo preferiblemente como se describe en el documento WO 2006/054063. La etapa de tratamiento de no lisis incluye cualquier tratamiento que no produce lisis de una proporción sustancial de las bacterias, células de mamíferos, levaduras, células de insectos u otro organismo usado para expresión de anticuerpos recombinantes, por ejemplo, de *E. coli*. En una realización de máxima preferencia, el tratamiento de no lisis comprende tratamiento a presión. De modo alternativo, el tratamiento de no lisis comprende una etapa de preacondicionamiento de agitación. Una "proporción sustancial" incluye una proporción del 80% o más de los organismos en una fermentación o cultivo presentes en forma intacta, más preferiblemente, más del 85%, incluso más preferiblemente, más del 90% y más preferiblemente, del 95% o más intacta.

45 La lisis se puede juzgar en cualquier forma conocida en la técnica, incluyendo: al mirar bajo un microscopio, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y ensayo de proteína total versus proteína en sobrenadante y/o en un pellet de organismo (célula). En una realización, la lisis se puede juzgar después de un tratamiento de no lisis al comparar la proteína total en una muestra antes y después del tratamiento. Si un tratamiento causa la lisis, la proteína total presente en el sobrenadante de la muestra tratada se incrementará en comparación con la proteína total presente en dicha muestra no tratada, por ejemplo, medida usando un ensayo de Bradford. En una realización preferida, se lleva a cabo el análisis de FACS, en el que la muestra se rotula con una tinte fluorescente seguido por tratamiento de no lisado y análisis de FACS. Con máxima preferencia, el análisis de FACS se lleva a cabo antes del tratamiento para dar un valor basal para comparación.

50 De esta manera, el tratamiento de no lisis puede incluir el preacondicionamiento por resuspensión moderada durante un período de tiempo, por ejemplo, por agitación o por resuspensión manual como pipeteado en, por ejemplo, un tampón. En una realización, el preacondicionamiento se lleva a cabo durante 1 hora a 24 horas, preferiblemente entre 1 hora y 20 horas, más preferiblemente, entre 2 horas y 18 horas, 4 horas y 16 horas, 6 horas y 16 horas y más preferiblemente, durante 12, 14 ó 16 horas. De esta manera, el tiempo mínimo para el preacondicionamiento es de 1, 2 ó 4 horas y el máximo es de 16, 18 ó 24 horas. El preacondicionamiento se puede llevar a cabo por rotación de 50 a 250 rpm, preferiblemente de 60 rpm a 100 rpm y más preferiblemente, durante 14 ó 16 horas. Durante el preacondicionamiento, las células se mantienen a una temperatura dentro del intervalo de 4 °C a 30 °C, más preferiblemente, entre 4 °C y 20 °C y más preferiblemente, a temperatura ambiente.

También se describe en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que también comprende someter la muestra a un tratamiento de no lisis incluyendo una etapa de acondicionamiento que no comprende parte del proceso.

5 También se describe en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que también comprende un tratamiento de no lisis que comprende someter las células huésped a mayores presiones, por ejemplo, usando una prensa francesa o descompresión con nitrógeno. En un ejemplo específico, la muestra es el producto de una fermentación de *E. coli*, donde dicha *E. coli* expresa un anticuerpo recombinante, que se somete a tratamiento de presión en una prensa francesa. Las presiones pueden variar de 750 psi a aproximadamente 5000 psi o aproximadamente. En una realización, el tratamiento de presión se lleva a cabo a 1000 psi o 1250 psi, 1500 psi, 1750 psi, 2000 psi, 2250 psi, 2500 psi, 2750 psi, 3000 psi, 3250 psi, 3500 psi, 4000 psi, 4250 psi, 4500 psi o 4750 psi. Con mayor preferencia, el tratamiento de presión se lleva a cabo entre 1000 psi y 3000 psi y más preferiblemente, a 2000 psi. El tratamiento de presión que es sustancialmente no lisis (es decir, que causa menos del 20% de lisis) se puede determinar por simple experimentación según el tampón y el tipo celular que comprende la muestra y la presión.

15 También se describe en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que no incluye una etapa de tratamiento de no lisis como se describió con anterioridad, como someter las células huésped a mayores presiones o acondicionamiento por resuspensión moderada durante un período de tiempo. La inclusión de tal etapa de tratamiento de no lisis se conoce por mejorar al rendimiento de una proteína recombinante (documento WO 2006/054063). Sin embargo, se ha hallado sorprendentemente que el mayor rendimiento de anticuerpo se logra por medio del método de la presente invención con o sin tal etapa de tratamiento de no lisis. Por consiguiente, en la realización en la que el método no comprende una etapa de tratamiento de no lisis, la presente invención proporciona un medio más simplificado y rentable para proporcionar un anticuerpo recombinante.

Etapa de mantenimiento

25 Se revela en la presente también un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que comprende una etapa de interrupción del método entre la etapa de cultivo de la muestra de células huésped y antes de la adición del tampón de extracción. Durante la etapa de interrupción, la muestra se mantiene a una temperatura apropiada. Esta etapa de interrupción del método se lleva a cabo preferiblemente como se describe en el documento WO 2005/019466. Esta etapa también se puede mencionar como una etapa de mantenimiento de suspensión celular (CSH). Con preferencia, el método se interrumpe durante un período de al menos aproximadamente una hora, 1 hora a 72 horas, 12 horas a 48 horas, durante 12 horas, 24 horas, 33 horas o 48 horas.

30 La muestra se mantiene preferiblemente a una temperatura apropiada durante la interrupción del método, como 18 °C.

También se describe en la presente un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes que no incluye una etapa de interrupción después de la etapa de cultivo de la muestra de células huésped, tal como se describe en el documento WO 2005/019466. La inclusión de tal interrupción se conoce para mejorar el rendimiento de una proteína recombinante (documento WO 2005/019466). Se halló sorprendentemente que se logra una mejora similar de rendimiento del anticuerpo por medio del método de la presente invención con o sin tal etapa de interrupción, es decir, no se observó un mayor incremento del rendimiento cuando se incluía la etapa de interrupción en el método. Por consiguiente, el método que no comprende una etapa de interrupción proporciona un medio más simplificado y rentable para proporcionar un anticuerpo recombinante. Por consiguiente, el período de tiempo entre la etapa de cultivo de la muestra de células huésped y la etapa de adición del tampón de extracción puede ser inferior a 12 horas, preferiblemente 10 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, 2 horas o menos o 1 hora o menos o menos de 1 hora.

Anticuerpo

45 Como se usa en la presente, 'anticuerpo funcional' incluye moléculas de anticuerpo que retienen la capacidad de reconocer específicamente o de unirse con el antígeno contra el que se criaron (antígeno cognado). La producción de un anticuerpo funcional se muestra por la presencia de una banda simple en SDS-PAGE no reductor correspondiente al peso molecular esperado del anticuerpo o por ensayo de unión directo usando BIAcore u otros métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, ELISA. Los anticuerpos no funcionales incluyen fragmentos que no reconocen su antígeno cognado e incluyen anticuerpos incorrectamente plegados o incorrectamente ensamblados, cadenas pesadas y livianas libres y sus fragmentos, incluyendo fragmentos parcialmente degradados de anticuerpos que no reconocen o se unen con su antígeno cognado.

50 En un ejemplo preferido, la molécula de anticuerpo recombinante es al menos parte de una cadena liviana de anticuerpo y al menos parte de una cadena pesada de anticuerpo, como al menos algunas de las moléculas de anticuerpo de cadena liviana y pesada expresada son capaces de combinarse para formar anticuerpo funcional.

55 Como se usan en la presente, 'anticuerpos' incluyen anticuerpos que tienen cadenas pesadas y liviana de longitud total; fragmentos funcionalmente activos, sus derivados o análogos y pueden ser, pero sin limitación, VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, un Fab de bisagra alterado, Fab', F(ab')₂ o fragmento Fv; un monómero o dímero de cadena liviana o de cadena pesada; un anticuerpo de cadena simple, por ejemplo, un Fv de cadena simple, en el que los dominios variables de cadena pesada y liviana se unen por medio de un ligador de péptidos o un anticuerpo de

especificidad dual como un Fab-dAb, tal como se describe en el documento PCT/GB2008/003331.

- Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales, bi-, tri- o tetravalentes, humanizados o quiméricos. Estos anticuerpos y sus fragmentos pueden ser anticuerpos naturales, humanizados, quiméricos o injertados con CDR y se pueden usar técnicas de biología molecular estándar para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios según se desee. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y una región de marco de una molécula de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, el documento US 5.585.089). Las moléculas de anticuerpo purificadas usando los métodos de la invención pueden ser de cualquier clase (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o una subclase de molécula de inmunoglobulina.
- Los métodos para crear estas moléculas de anticuerpo se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, Shrader et al., WO 92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341:544; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322:323; Bird et al, 1988, Science, 242:423; Queen et al., US 5.585.089; Adair, WO 91/09967; Mountain and Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10:1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181).
- Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por medio de cualquier método conocido en la técnica como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).
- Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que fueron genéticamente manipulados por ingeniería de modo que los genes de cadena liviana y pesada están compuestos por segmentos génicos de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Estos anticuerpos quiméricos son probablemente menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes se pueden preparar por medio de métodos conocidos en la técnica (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539; WO 93/08829, Trauneker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659). Los anticuerpos bi-, tri- y tetravalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (ver, por ejemplo, el documento WO 92/22853).
- Las secuencias de anticuerpo también se pueden generar usando métodos de anticuerpos linfocíticos simples a base de clonación molecular y expresión de cADN de región variable de inmunoglobulina generado de linfocitos simples que se seleccionaron para la producción de anticuerpos específicos tal como se describe por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848 y en el documento WO 92/02551. Los últimos métodos se basan en el aislamiento de células productoras de anticuerpos individuales que luego se expanden clonalmente seguido por control de estos clones que producen un anticuerpo que reconoce su antígeno cognado y, si se desea, la posterior identificación de la secuencia de sus genes de cadena pesada (V_H) y liviana (V_L) variable. De modo alternativo, los anticuerpos que producen células que reconocen su antígeno cognado se pueden cultivar juntos seguido de control.
- Los anticuerpos preparados usando los métodos de la invención son más preferiblemente anticuerpos humanizados que se pueden ligar posteriormente a toxinas, fármacos, compuestos citotóxicos o polímeros u otros compuestos que prolongan la vida útil del anticuerpo cuando se administran a un paciente.
- El anticuerpo puede ser específico de cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a células, por ejemplo, una proteína de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante tales como aquellas proteínas reguladas hacia arriba durante la enfermedad o la infección, por ejemplo, receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos particulares de proteínas de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como integrinas $\beta 1$, por ejemplo, VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o receptor de CSF1, DPCR1, DPCR1, dudulina2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, símil nectina 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos MHC de clase I y MHC de clase II, KDR y VEGF y, de ser apropiado, sus receptores.
- Los antígenos solubles incluyen interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos virales, por ejemplo, virus sincicial respiratorio o antígeno de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (antes conocido como factor de necrosis tumoral α), factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, de ser apropiado, sus receptores. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionúclidos y metales pesados y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En una realización, el anticuerpo se puede usar para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o

indirectamente.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF, más preferiblemente, un Fab' anti-TNF, como se describe en el documento WO 01/094585.

5 Los métodos para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos apropiados de células huésped para la expresión de moléculas de anticuerpos recombinantes incluyen bacterias tales como bacterias gram positivas o gram negativas, *por ejemplo E. coli*. Con máxima preferencia, en los métodos de la invención, se produce un anticuerpo recombinante en bacterias, *por ejemplo E. coli* (ver Verma et al., 1988, J. Immunol. Methods 216:165–181; Simmons et al., 2002, J. Immunol. Methods 263:133–147).

Células

10 El término "muestra" usado en la presente invención se refiere a una población de células que fueron transformadas con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante. La muestra puede estar en cualquier escala apropiada para producción de anticuerpos en menor escala a producción de anticuerpo en gran escala para fines comerciales.

15 Las células usadas en la presente invención pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, bacterias, en especial bacterias gram-negativas. Con máxima preferencia, las células son *E. coli*. Las células pueden ser células de tipo salvaje o células recombinantes que fueron genéticamente manipuladas. Las células huésped de *E. coli* pueden ser cepas de *E. coli* naturales o cepas mutadas capaces de producir proteínas recombinantes. Los ejemplos de cepas de *E. coli* huésped específicas incluyen MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5a, DH1, BL21, K12, XL1Blue y JM109. Un ejemplo es W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325), una cepa huésped comúnmente usada para fermentaciones de proteínas recombinantes. Los ejemplos también incluyen cepas de *E. coli* modificadas, por ejemplo, mutantes metabólicas y cepas deficientes de proteasa.

20 El anticuerpo recombinante producido usando los métodos de la presente invención se expresa normalmente en el periplasma de célula huésped de *E. coli* o en el sobrenadante de cultivo de células huésped, según la naturaleza de la proteína y la escala de producción. Los métodos para proteínas diana dirigidas a estos compartimientos son bien conocidos en la técnica, para una reseña, ver Makrides, Microbiological Reviews, 1996, 60, 512–538. Los ejemplos de secuencias señal apropiadas para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen las secuencias señal PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF de *E. coli*. Las proteínas se pueden dirigir al sobrenadante confiando en las vías secretoras naturales o por inducción de fuga limitada de la membrana exterior para causar la secreción de la proteína, ejemplos de los cuales son el uso de *peIB* líder, la proteína A líder, la coexpresión de proteína de liberación de bacteriocina, la proteína de liberación de bacteriocina inducida por mitomicina junto con la adición de glicina al medio de cultivo y la coexpresión del gen *kil* para la permeabilización de la membrana. Con máxima preferencia, en los métodos de la invención, la proteína recombinante se expresa en el periplasma de *E. coli* huésped.

25 La expresión de la proteína recombinante en las células huésped de *E. coli* también puede estar bajo el control de un sistema inducible, donde la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* está bajo el control de un promotor inducible. Muchos promotores inducibles apropiados para usar en *E. coli* son bien conocidos en la técnica y según el promotor, la expresión de la proteína recombinante se puede inducir por distintos factores tales como temperatura o la concentración de una sustancia particular en el medio de crecimiento (Baneyx, Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10:411–421; Goldstein y Doi, 1995, Biotechnol. Annu. Rev., 105–128). Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores *lac*, *tac* y *trc* de *E. coli* que son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los promotores *phoA*, *trp* y *araBAD* que se inducen por fosfato, triptófano y L-arabinosa, respectivamente. La expresión se puede inducir, por ejemplo, por la adición de un inductor o un cambio en la temperatura donde la inducción depende de la temperatura. Cuando se logra la inducción de expresión de proteína recombinante por adición de un inductor al cultivo, el inductor se puede añadir por cualquier método apropiado según el sistema de fermentación y el inductor, por ejemplo, por adiciones repentinas simples o múltiples o por una adición gradual de inductor a través de una materia prima. Se apreciará que puede haber una demora entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión de la proteína, por ejemplo, cuando el inductor es lactosa, puede haber una demora antes de que ocurra la inducción de expresión de proteína mientras se utiliza cualquier fuente de carbono preexistente antes de la lactosa.

35 Los cultivos de células huésped de *E. coli* (fermentaciones) se pueden cultivar en cualquier medio que soportará el crecimiento de *E. coli* y expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio químicamente definido, como aquellos proporcionados en Pirt S.J. (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation, Blackwell Scientific Publications, con modificaciones apropiadas para controlar la tasa de crecimiento como se describe en la presente. Un ejemplo de un medio apropiado es 'SM6E' como se describe por Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26:309–320.

55 El cultivo de las células huésped de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente apropiado como un recipiente de agitación o un fermentador según la escala de producción requerida. Varios fermentadores en gran escala están disponibles con una capacidad de más de 1000 litros hasta aproximadamente 100000 litros. Con preferencia, se usan fermentadores de 1000 a 50000 litros, más preferiblemente, de 1000 a 10000 ó 12000 litros. Se pueden usar también

fermentadores de menor escala con una capacidad de entre 0,5 y 1000 litros.

5 La fermentación de *E. coli* se puede llevar a cabo en cualquier sistema apropiado, por ejemplo, en modo continuo, discontinuo o de alimentación por lotes (Thiry & Cingolani, 2002, Trends in Biotechnology, 20:103–105) según la proteína y los rendimientos requeridos. El modo discontinuo se puede usar con adiciones repentinas de nutrientes o inductores, cuando sea necesario. De modo alternativo, se puede usar un cultivo de alimentación por lotes y los cultivos crecidos en preinducción en modo discontinuo a la máxima tasa de crecimiento específica que se puede sostener usando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o varios regímenes de alimentación de nutrientes usados para controlar la tasa de crecimiento hasta que la fermentación esté completa. El modo de alimentación por lotes también se puede usar como preinducción para controlar el metabolismo de las células huésped de *E. coli* y para permitir mayores densidades celulares por alcanzar (Lee, 1996, Tibtech, 14:98–105).

10 Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las otras realizaciones *mutatis mutandis*.

También se describe en la presente un anticuerpo obtenido u obtenible de dicho proceso.

15 También se describe en la presente el uso de medios de control del pH, como un tampón, para mejorar la extracción de anticuerpos, por ejemplo, extracción primaria, en particular donde el control asegurar que el pH se mantiene en el intervalo de pH de 6 a 9 durante una etapa de extracción, como una etapa de extracción por calor.

El medio de control del pH como se emplea en la presente es un tampón, una base y/o un ácido.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y no se deben construir de modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

20 Figura 1 es un gráfico que muestra el pH de células resuspendidas en tampón de extracción de Tris/EDTA de pH 7,4 y pH 8 en el tiempo.

Figura 2a es un histograma que muestra el efecto del pH del tampón de extracción sobre el rendimiento de anticuerpo A.

25 Figura 2b es un histograma que muestra el pH de muestras celulares (suspensión celular resuspendida) directamente después de la adición de un tampón de extracción que tiene un pH de 7,4 a 9,0 y el pH de las muestras celulares 1 hora después de la adición del tampón de extracción antes de la fase de calentamiento.

Figura 3a es un histograma que muestra el efecto de ajuste del pH de la muestra antes de la etapa de tratamiento térmico sobre el rendimiento del anticuerpo A. Las cantidades sobre cada barra indican el % de incremento en el rendimiento en comparación con el control sin etapa de ajuste del pH.

30 Figura 3b es un gráfico que muestra el pH variante de las muestras a través de las diversas etapas del método: la suspensión celular (después de cultivo y centrifugación); adición posttampón (directamente después de la adición del tampón de extracción); preajuste del pH; posajuste del pH pero fase de precalentamiento; y etapa de postratamiento térmico.

35 Figura 4 muestra un análisis de SDS–PAGE de muestras de anticuerpo A extraídas de células después del tratamiento térmico. El carril 1 es un marcador de peso molecular, el carril 2 es una muestra de anticuerpo A, el carril 3 es la muestra después de ningún ajuste del pH y los carriles 4 a 8 exhiben muestras después del ajuste del pH a 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 y 7,8 respectivamente, antes de la etapa de tratamiento térmico.

40 Figura 5 es un histograma que muestra el efecto de uso de un tampón de extracción a pH 8 y ajuste del pH de la muestra a pH 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico sobre el rendimiento del anticuerpo A. Figura 5 también muestra el efecto de inclusión de una etapa de homogeneización o una etapa de mantenimiento de suspensión celular. Los números sobre cada barra indican el % de incremento del rendimiento en comparación con el control con una etapa de homogeneización pero sin etapa de ajuste del pH.

Figura 6 muestra un análisis de SDS–PAGE de muestras de anticuerpo A extraídas de células después del tratamiento térmico.

45 El carril 1 es un marcador de peso molecular;

El carril 2 es una muestra de anticuerpo A;

El carril 3 es la muestra después de una etapa de homogeneización pero ningún ajuste del pH y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

50 El carril 4 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y una etapa de homogeneización y ningún mantenimiento de suspensión celular;

El carril 5 es la muestra después de ningún ajuste del pH, ninguna homogeneización y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

El carril 6 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y ninguna homogeneización y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

- 5 El carril 7 es la muestra después del mantenimiento de la suspensión celular pero ningún ajuste del pH y ninguna homogeneización;

El carril 8 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y un mantenimiento de la suspensión celular pero ninguna homogeneización.

- 10 Figura 7 es un gráfico que muestra el pH de la muestra en el tiempo para una muestra de control que no tiene ajuste del pH, una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 8, una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 7,4 y un ajuste del pH de la muestra a pH 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico y una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 8 y un ajuste del pH de la muestra a pH 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico. El primer pico muestra el punto en el que se añadió el tampón de extracción y el segundo pico muestra el punto en el que el pH de las dos muestras se ajustó antes de la etapa de tratamiento térmico.

- 15 Figura 8 es un histograma que muestra el efecto de una muestra de control que no tiene ajuste del pH, una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 7,4 y un ajuste del pH de la muestra a pH 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico, una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 8 y una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 8 y un ajuste del pH de la muestra a pH 7,4 antes de la etapa de tratamiento térmico sobre el rendimiento del anticuerpo A. Los números sobre cada barra indican el % de incremento de rendimiento en comparación con el control sin etapa de ajuste de pH.
- 20

- Figura 9 es un histograma que muestra el efecto de una muestra de control que no tiene ajuste del pH, una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 7,4 y ajuste del pH de la muestra a 7,4 durante la fase de calentamiento antes de la etapa de tratamiento térmico y una muestra que se trató con tampón de extracción de pH 8 y ajuste del pH de la muestra a 7,4 durante la fase de calentamiento antes de la etapa de tratamiento térmico sobre el rendimiento de anticuerpo A. Los números sobre cada barra indican el % de incremento de rendimiento en comparación con el control sin etapa de ajuste del pH.
- 25

- Figura 10 es un histograma que muestra el efecto de ajuste del pH a 6,6, 7,0, 7,4 y 7,8 unidades sobre el título de Fab' en comparación con un no control del ajuste del pH. El experimento se repite con tres diferentes etapas de pretratamiento (antes de la extracción) de no pretratamiento, mantenimiento de la suspensión celular y homogeneización.
- 30

- Figura 11 es un histograma que muestra el título Fab' promedio de las siguientes condiciones; ningún ajuste del pH, ningún pretratamiento y ajuste del pH (hasta el intervalo de 6,6 – 7,8 unidades), homogeneización y ajuste del pH (hasta el intervalo de 6,6 – 7,8 unidades) y todas las condiciones de ajuste del pH (homogeneización y ningún pretratamiento). Las barras de error muestran una desviación estándar de la media.
- 35

MÉTODO GENERAL

En los siguientes ejemplos, el método se lleva a cabo de la siguiente manera, a menos que se establezca otra cosa:

Etapas de cultivo celular & centrifugación:

- 40 El anticuerpo A (un Fab') se expresó en células W3110 de *E. coli* usando el vector pTT0D con ADN que codificaba el anticuerpo A insertado. La fermentación se llevó a cabo a 25 °C durante 30 horas después de la inducción con lactosa y listo para cosechar. 50 ml o 1 L de alícuotas de cultivo cosechado se centrifugaron durante 1 hora a 4200 RPM y a 4 °C.

El sobrenadante se decantó y para simular la clarificación en escala de producción, se añadió una pequeña proporción de sobrenadante a las células para llevar la muestra resultante de suspensión celular al 35% del peso cosechado.

Etapas de mantenimiento de suspensión celular (CSH):

- 45 En algunos experimentos, se llevó a cabo una etapa de mantenimiento de la suspensión celular, en donde la muestra se mantuvo durante 33 horas a 18 °C y 200 RPM antes de la adición del tampón de extracción.

Adición de tampón de extracción:

- 50 La muestra de suspensión celular resultante (de ahora en más en la presente mencionada como la muestra) se resuspendió usando una solución madre de 300 mM de Tris y 30 mM de EDTA hasta una concentración final de 100 mM de Tris y 10 mM de EDTA con un pH ajustado de 7,4 usando HCl. En experimentos descritos más abajo, el pH de este tampón de extracción se ajusta a partir del control pH de 7,4 a mayores niveles de pH de entre pH 7,4 y 9,0.

Etapa de homogeneización (homog.):

En algunos experimentos, una etapa de homogeneización se llevó a cabo después de la adición del tampón de extracción por un único pasaje a 1500 psi.

Ajuste del pH antes de la fase de calentamiento:

- 5 En algunos experimentos, la muestra se sometió a un ajuste del pH con NaOH 5 M hasta un nivel deseado de entre 7,0 y 7,8 antes de iniciar la fase de calentamiento.

Fase de calentamiento

Las muestras se sometieron a una fase de calentamiento en donde la temperatura de la muestra se elevó desde 18 °C hasta la temperatura elevada deseada de 59 °C, a la cual se inició la etapa de tratamiento térmico.

- 10 *Ajuste del pH durante la fase de calentamiento:*

En algunos experimentos, la muestra se sometió a un ajuste del pH con NaOH 5 M hasta un nivel deseado de 7,4 ± 0,02 durante la fase de calentamiento hasta alcanzar la temperatura elevada deseada de 59 °C.

Etapa de tratamiento térmico

La muestra se mantuvo a 59 °C durante 10 a 12 horas y 200 RPM.

- 15 Postratamiento térmico, los pellets celulares resuspendidos se clarificaron por centrifugación a 4200 rpm durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante que contenía anticuerpo A funcional se ensayó respecto de Fab' usando análisis de HPLC de proteína G en 20 mM de tampón de fosfato. El anticuerpo A se eluyó usando un gradiente de pH de pH 7,0 en inyección, reduciendo el pH a 2,5.

- 20 Las muestras de extracto reducidas se corrieron en geles de Tris–Glicina SDS–PAGE con una concentración de carga de aproximadamente 1 µg.

EJEMPLO 1: Efecto sobre el pH de la muestra después de la adición de un tampón de extracción

- 25 La etapa de cultivo celular y la etapa de adición de tampón de extracción, en donde el tampón tenía un pH de 8,0 o pH 7,4) se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales. El pH de la muestra se controló a partir de la adición del tampón de extracción. Figura 1 muestra que hay una rápida caída en el pH de la muestra después de la adición del tampón y el pH cae rápidamente a menos de pH 7, en especial cuando el tampón tiene un pH de 7,4.

EJEMPLO 2: Efecto del pH del tampón de extracción sobre el rendimiento de anticuerpo

La etapa de cultivo celular, la etapa de adición de tampón de extracción, la fase de calentamiento y la etapa de tratamiento térmico se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales.

- 30 La etapa de mantenimiento de la suspensión celular, la etapa de homogeneización y la etapa de ajuste del pH antes o durante el calentamiento no se llevaron a cabo.

- 35 El pH del tampón de extracción se varió en la siguiente forma: 7,4, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 y 9,0. Los resultados se muestran en la Figura 2a que muestra las concentraciones de Fab' después de la extracción de calor. Se puede ver que un pH elevado del tampón de extracción a más de 7,4 daba como resultado un significativo aumento de la recuperación de Fab', aumentando el rendimiento hasta pH 8,8. A mmás de 8,8, las concentraciones de Fab' comenzaban a declinar.

Tabla 1

pH del tampón de extracción	pH de la muestra después de la centrifugación adición del tampón de preextracción	pH de la muestra después de la adición del tampón de extracción	pH de la muestra después de 1 hora de mantenimiento precalentamiento	pH de la muestra después del tratamiento térmico
7,4	5,25	6,36	5,67	5,54
8	5,25	7,62	6,35	5,8
8,1	5,26	7,74	6,53	5,85
8,2	5,26	7,87	6,96	5,96

8,3	5,26	7,98	7,4	6,17
8,4	5,27	8,07	7,62	6,44
8,5	5,26	8,16	7,84	6,9
8,6	5,28	8,23	7,98	7,23
8,7	5,27	8,3	8,12	7,59
8,8	5,26	8,37	8,19	7,73
8,9	5,27	8,42	8,31	8,03
9	5,28	8,51	8,41	8,17

La Tabla 1 y la Figura 2b muestran el pH de las muestras celulares (suspensión celular resuspendida) directamente después de la adición del tampón de extracción con un pH de 7,4 a 9,0 y el pH de las muestras celulares 1 hora después de la adición del tampón de extracción antes de la fase de calentamiento.

5 EJEMPLO 3: Efecto del pH antes de la fase de calentamiento sobre el rendimiento del anticuerpo

La etapa de cultivo celular, la etapa de adición de tampón de extracción, la etapa de homogeneización, la etapa de ajuste del pH antes del calentamiento, la fase de calentamiento y la etapa de tratamiento térmico se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales. El control no se sometió a una etapa de ajuste del pH.

10 En el experimento de control, el tampón de extracción era de pH 7,4 y en los otros experimentos, cuando el pH se ajustaba antes de la fase de calentamiento, el tampón de extracción era de pH 8,0.

La etapa de mantenimiento de la suspensión celular y la etapa de ajuste del pH durante el calentamiento no se llevaron a cabo.

En el control, no se llevó a cabo un ajuste del pH antes de la fase de calentamiento. En los otros experimentos, el pH de la muestra se ajustó antes de la fase de calentamiento a pH 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 y 7,8.

15 Los resultados se muestran en la Figura 3a que indica que esta etapa de ajuste del pH daba como resultado mayor recuperación de Fab'. La Figura 3a demuestra cómo el ajuste del pH indica dentro de un intervalo de pH 7,0 a 7,8 una mayor recuperación de producto de un 26 a un 40% en comparación con la muestra de control que no se sometió a un ajuste del pH.

Tabla 2

20 Etapa de proceso

	1	2	3	4	5
Muestra	pH de la suspensión celular	pH de adición postampón	Ajusta del pH pre pH	Posajuste del pH / pH de precalentamiento	pH de postratamiento térmico
Control	5,44	6,84	5,99	5,99	5,52
ajuste del pH a 7,0	5,44	7,7	6,82	7	5,61
ajuste del pH a 7,2	5,44	7,7	6,75	7,2	5,67
ajuste del pH a 7,4	5,44	7,7	6,65	7,4	5,62
ajuste del pH a 7,6	5,44	7,7	6,61	7,6	5,71
ajuste del pH a 7,8	5,44	7,7	6,55	7,8	5,7

25 El pH de la muestra se detectó en varios puntos en el método. La Tabla 2 anterior y la Figura 3b muestran el pH variante de las muestras a través de las distintas etapas del método: la suspensión celular (después del cultivo y la centrifugación); adición postampón (directamente después de la adición del tampón de extracción); preajuste del pH; posajuste del pH pero fase de precalentamiento; y etapa de postratamiento térmico.

El gel de SDS–PAGE en la Figura 4 muestra los perfiles de proteína de las muestras de posextracción. El carril 1 es un marcador de peso molecular, El carril 2 es una muestra de anticuerpo A, El carril 3 es la muestra después de ningún ajuste del pH y los carriles 4 a 8 muestran las muestras después del ajuste del pH a 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 y 7,8 respectivamente antes de la etapa de tratamiento térmico.

- 5 El peso de carga de la muestra se normalizó en 1 µg de Fab'. No se observaron significativas diferencias en los perfiles de proteína entre el control y las muestras con ajuste del pH de precalentamiento.

EJEMPLO 4: Efecto del pH del tampón de extracción y ajuste del pH sobre el rendimiento de anticuerpo en presencia y en ausencia de una etapa de mantenimiento celular y etapa de homogeneización

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales.

- 10 • Control (con homog.): etapa de cultivo celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 7,4), etapa de homogeneización, fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico;
- Tampón a pH 8 y ajuste de precalentamiento a pH 7,4 (con homog.): etapa de cultivo celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 8), etapa de homogeneización, etapa de ajuste del pH antes del calentamiento a pH 7,4, fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico;
- 15 • Control (sin homog. o CSH): etapa de cultivo celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 7,4), fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico;
- Tampón a pH 8 y ajuste de precalentamiento a pH 7,4 (sin homog. o CSH): etapa de cultivo celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 8), etapa de ajuste del pH antes del calentamiento a pH 7,4, fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico;
- 20 • Control (con CSH): etapa de cultivo celular, etapa de mantenimiento de la suspensión celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 7,4), fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico; y
- Tampón a pH 8 y ajuste de precalentamiento a pH 7,4 (con CSH): etapa de cultivo celular, etapa de mantenimiento de la suspensión celular, etapa de adición de tampón de extracción (pH 8), etapa de ajuste del pH antes del calentamiento a pH 7,4, fase de calentamiento y etapa de tratamiento térmico.

- 25 Figura 5 muestra los resultados de los experimentos anteriores. Se puede ver que la adición de la etapa de ajuste del pH antes del calentamiento daba como resultado aproximadamente el 34% de títulos de mayor extracción en comparación con el control. También se puede ver que la inclusión de la etapa de homogeneización no tenía efecto sobre el rendimiento en comparación con el método con la etapa de ajuste del pH. El mantenimiento de suspensión celular da un mayor rendimiento cuando se compara con extracciones de control, pero no cuando se los compara con
- 30 la etapa de ajuste del pH.

El gel de SDS–PAGE en la Figura 6 muestra los perfiles de proteína de muestras de posextracción. El carril 1 es un marcador de peso molecular;

El carril 2 es una muestra de anticuerpo A;

- 35 El carril 3 es la muestra después de una etapa de homogeneización pero ningún ajuste del pH y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

El carril 4 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y una etapa de homogeneización y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

- 40 El carril 5 es la muestra después de ningún ajuste del pH, ninguna homogeneización y ningún mantenimiento de la suspensión celular; el carril 6 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y ninguna homogeneización y ningún mantenimiento de la suspensión celular;

El carril 7 es la muestra después del mantenimiento de la suspensión celular pero ningún ajuste del pH y ninguna homogeneización; el carril 8 es la muestra después del tratamiento con tampón de extracción a pH 8 y ajuste a pH 7,4 antes del tratamiento térmico y un mantenimiento de la suspensión celular pero ninguna homogeneización.

- 45 Los perfiles de proteína de extractos con ajuste del pH eran comparables con los controles de mantenimiento de la suspensión celular.

EJEMPLO 5: Efecto del pH del tampón de extracción y/o la etapa de ajuste del pH antes del calentamiento sobre el pH de la muestra y rendimiento de Fab'.

- 50 La etapa de cultivo celular, la etapa de adición de tampón de extracción, la fase de calentamiento y la etapa de tratamiento térmico se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales. Dos experimentos incluían un ajuste del pH antes de la etapa de calentamiento y dos no incluyeron esta etapa.

La etapa de mantenimiento de la suspensión celular, la etapa de homogeneización y la etapa de ajuste del pH durante el calentamiento no se llevaron a cabo.

Se llevaron a cabo cuatro diferentes estrategias de control del pH:

1. Control: tampón de extracción pH 7,4 y ningún ajuste del pH antes del calentamiento;
- 5 2. Tampón de extracción pH 7,4 y ajuste del pH a 7,4 antes del calentamiento;
3. Buffer pH 8: tampón de extracción pH 8,0 y ningún ajuste del pH antes del calentamiento; y
4. Tampón de extracción pH 8,0 y ajuste del pH a 7,4 antes del calentamiento.

10 El pH se controló a lo largo de la recuperación primaria a partir de la suspensión celular pasando por la adición de tampón (primer pico), ajuste del pH antes del calentamiento (segundo pico) y tratamiento térmico (caída del pH). La Figura 7 muestra el perfil del pH durante los métodos.

El efecto sobre el rendimiento de Fab' se muestra en la Figura 8, donde se puede ver que todas las estrategias de elevación del pH (1 a 3) daban como resultado un incremento del rendimiento de Fab' y la estrategia 4 usando una combinación de tampón elevado y el ajuste de precalentamiento del pH dio como resultado las máximas recuperaciones de Fab'.

15 EJEMPLO 6: Efecto del pH del tampón de extracción y/o la etapa de ajuste del pH durante el calentamiento sobre el pH de la muestra y rendimiento de Fab'.

La etapa de cultivo celular, la etapa de adición de tampón de extracción, la fase de calentamiento y la etapa de tratamiento térmico se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos generales. Dos experimentos incluyeron un ajuste del pH durante la etapa de calentamiento y el control no incluía esta etapa.

20 La etapa de mantenimiento de la suspensión celular, la etapa de homogeneización y la etapa de ajuste del pH antes del calentamiento no se llevaron a cabo.

Se llevaron a cabo tres diferentes estrategias de control del pH:

1. Control: tampón de extracción pH 7,4 y ningún ajuste del pH durante el calentamiento;
2. Tampón de extracción pH 7,4 y ajuste del pH a 7,4 durante el calentamiento;
- 25 3. Tampón de extracción pH 8,0 y ajuste del pH a 7,4 durante el calentamiento.

El efecto sobre el rendimiento de Fab' se muestra en la Figura 9, donde se puede ver que todas las estrategias de elevación del pH (2 y 3) daban como resultado un incremento del rendimiento de Fab' y la estrategia 4 usando una combinación de tampón elevado y el ajuste del pH durante el calentamiento dio como resultado las más altas recuperaciones de Fab'.

30 EJEMPLO 7

El experimento se llevó a cabo tomando el caldo de fermentación y centrifugando para remover la mayor parte del medio gastado, produciendo así una suspensión celular. Esta suspensión celular se mantuvo en el caso del mantenimiento de la suspensión celular durante 33 horas. En el caso de las condiciones homogeneizados y ningún pretratamiento, las células se resuspendieron en tampón de extracción y ya sea se homogeneizaron o se extrajeron con calor sin ningún pretratamiento. Después del mantenimiento de la suspensión celular, las células se resuspendieron en tampón de extracción. Una vez que todas las condiciones se resuspendieron en tampón de extracción, se ajustaron en el pH hasta el punto deseado (mostrado en la Figura 12) y se inició la extracción con calor (59 °C durante 10 horas). Después de la extracción con calor, el extracto se clarificó por centrifugación a fin de determinar el título de Fab' en la fase líquida.

40

ES 2 647 387 T3

Los datos de abajo también se representan en la Figura 12.

sin pretratamiento, sin ajuste del pH			
Pretratamiento	Ajuste del pH	Posextracción (g/L)	Aumento respecto del control (%)
CSH	na	0,419	19,27
CSH	n/a	0,402	14,52
CSH	7	0,412	17,40
CSH	7,4	0,408	16,29
CSH	7,8	0,435	23,86
Ninguno	na	0,351	0,00
Ninguno	6,6	0,421	19,89
Ninguno	7	0,412	17,40
Ninguno	7,4	0,399	13,63
Ninguno	7,8	0,403	14,72
Homogeneización	na	0,359	2,29
Homogeneización	6,6	0,392	11,79
Homogeneización	7	0,394	12,16
Homogeneización	7,4	0,403	14,80
Homogeneización	7,8	0,420	19,60
El control era ningún pretratamiento y ningún control del pH			

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes seleccionados de un Fab, Fab modificado, un Fab de bisagra alterado, Fab', F(ab')₂ o fragmento de Fv; un anticuerpo de cadena simple; un Fv de cadena simple, en el que los dominios variables de cadena pesada y de cadena liviana se unen por medio de un ligador de péptidos y un anticuerpo de especificidad dual, como un Fab-dAb que comprende
 - a) cultivar una muestra de células huésped de bacterias gram-negativas transformadas con un vector de expresión que codifica una molécula de anticuerpo recombinante;
 - b) añadir un tampón de extracción con un pH de 7,5 a 9 a la muestra; y
 - c) someter la muestra a una etapa de tratamiento térmico dentro de un intervalo de 40 °C a 70 °C durante 1 a 24 horas;
- 5 10 caracterizado por que el pH de la muestra se detecta después de la adición del tampón de extracción y se ajusta para asegurar que el pH de la muestra sea de 7 a 9 antes de la etapa de tratamiento térmico.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el pH se detecta antes y durante la fase de calentamiento, durante la cual la temperatura de la muestra se eleva a la temperatura elevada deseada.
3. El método según la reivindicación 2, en donde el pH es inferior durante que antes de la fase de calentamiento.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde el pH de la muestra se controla de modo continuo a partir del punto de adición del tampón de extracción hasta el inicio de la etapa de tratamiento térmico.
5. El método según la reivindicación 4, en donde el pH de la muestra se controla de modo continuo durante la etapa de tratamiento térmico.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo dentro del intervalo de 40 °C a 65 °C.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tampón de extracción es tampón de Tris.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el pH de la muestra se ajusta con NaOH, NH₄OH, ácido sulfúrico, EDTA o tampón de Tris.
- 25 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es específico de un antígeno seleccionado de integrinas, interleuquinas, interferones, antígenos virales, TNF, factores estimulantes de colonias y factores de crecimiento derivados de plaquetas.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la célula huésped es *E. coli*.
11. El método según la reivindicación 10, en donde la molécula de anticuerpo se expresa en el periplasma de *E. coli*.
- 30 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el método comprende adicionalmente una etapa de filtración, de centrifugación o de cromatografía de intercambio iónico o una combinación de ellas.

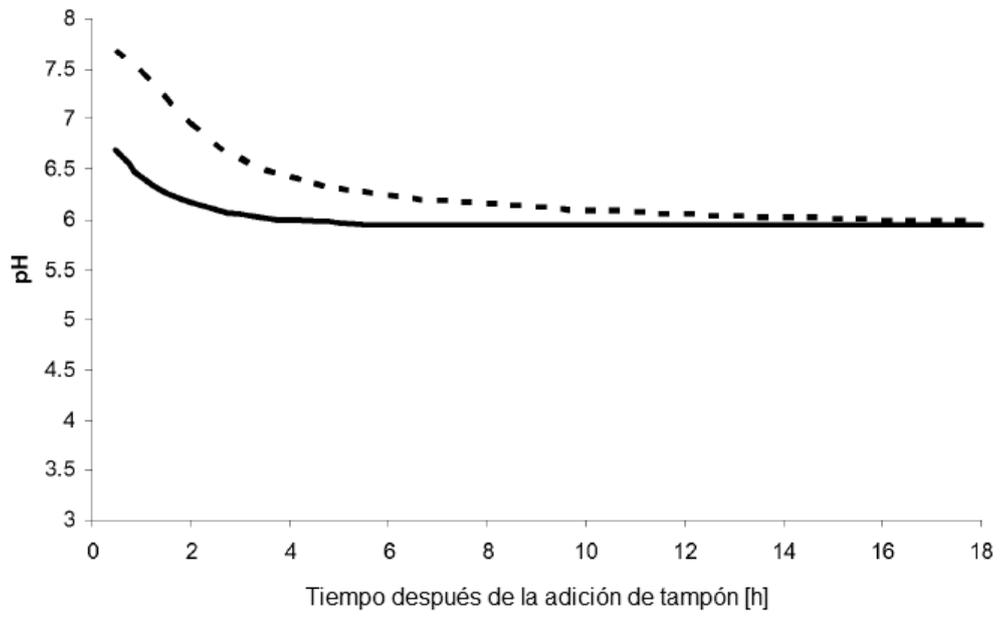


Figura 1

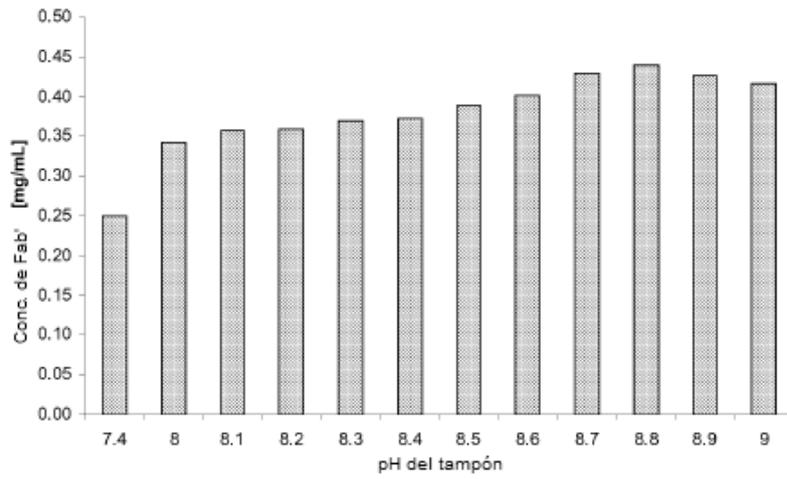


Figura 2a

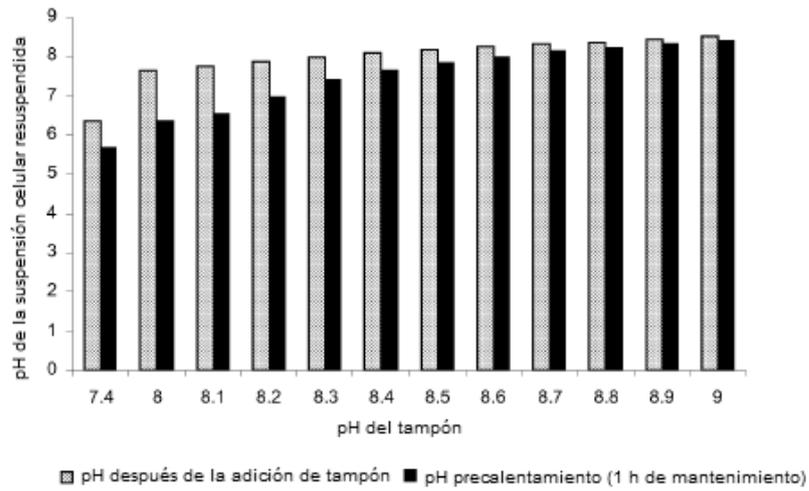


Figura 2b

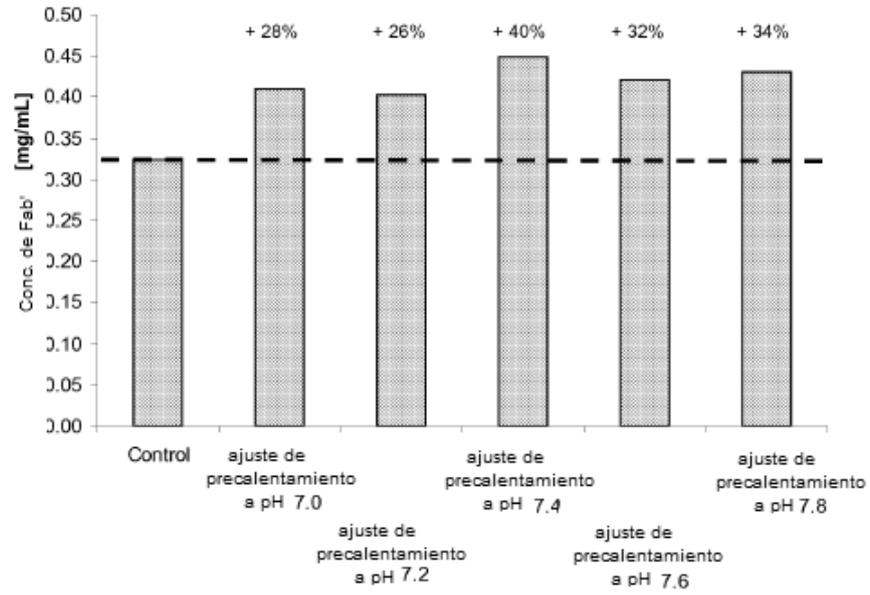


Figura 3a

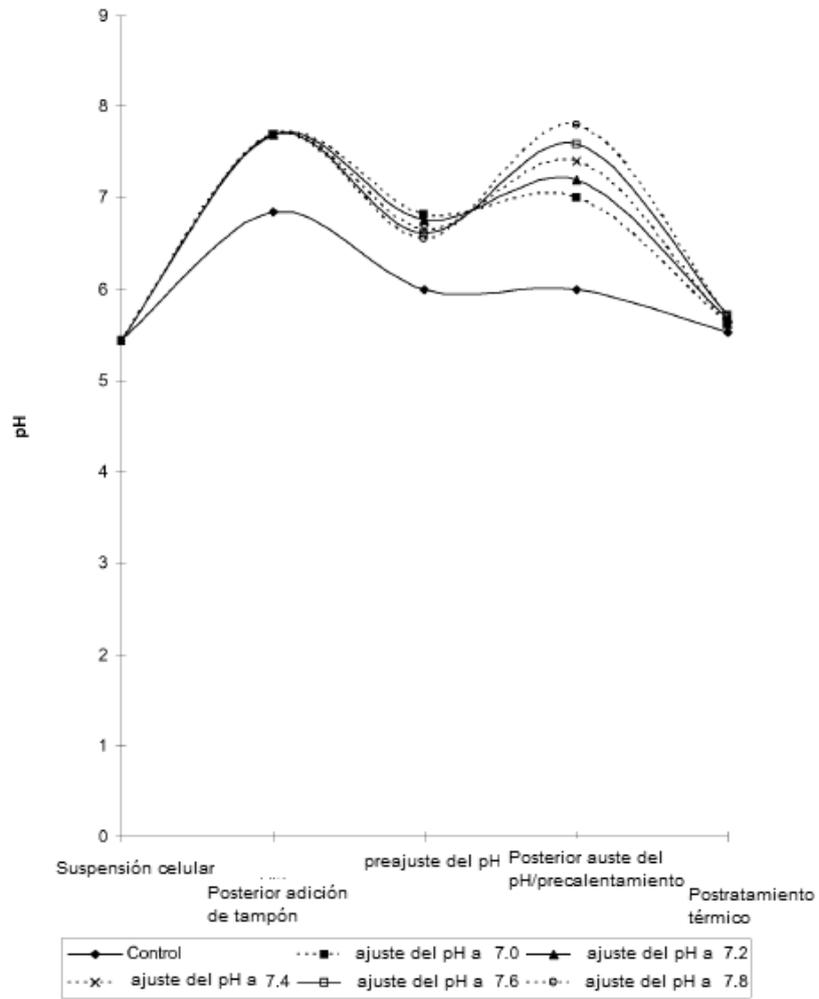


Figura 3b

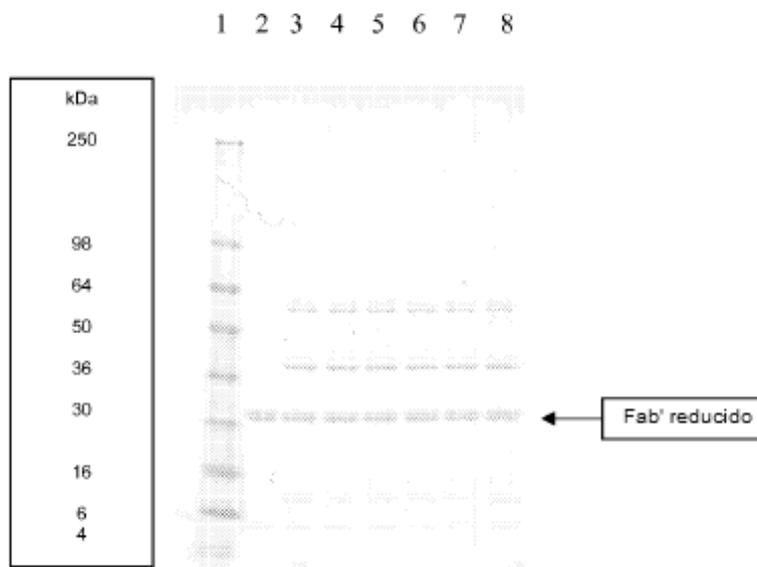


Figura 4

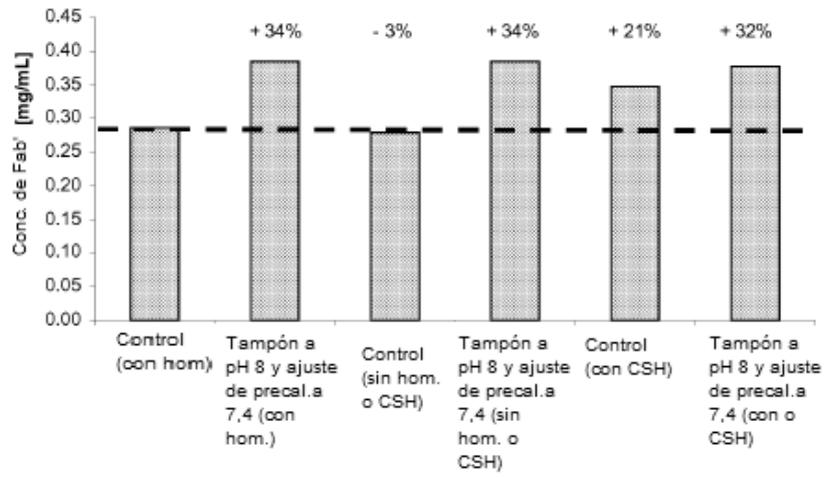


Figura 5

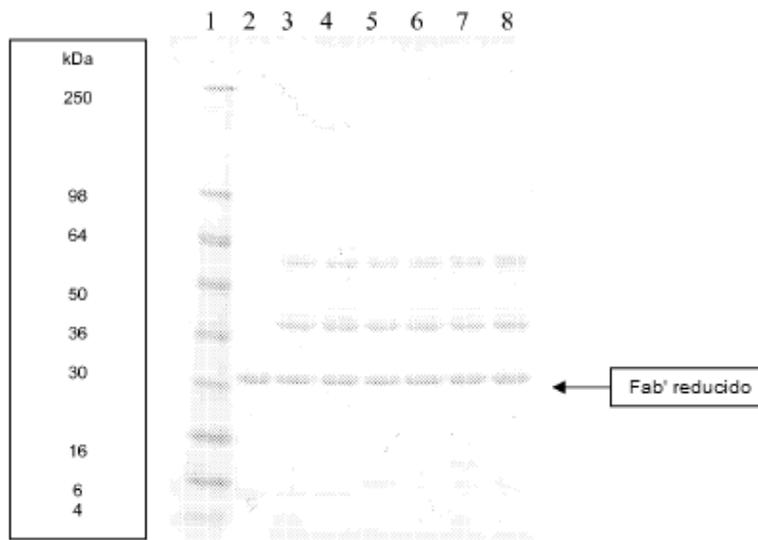
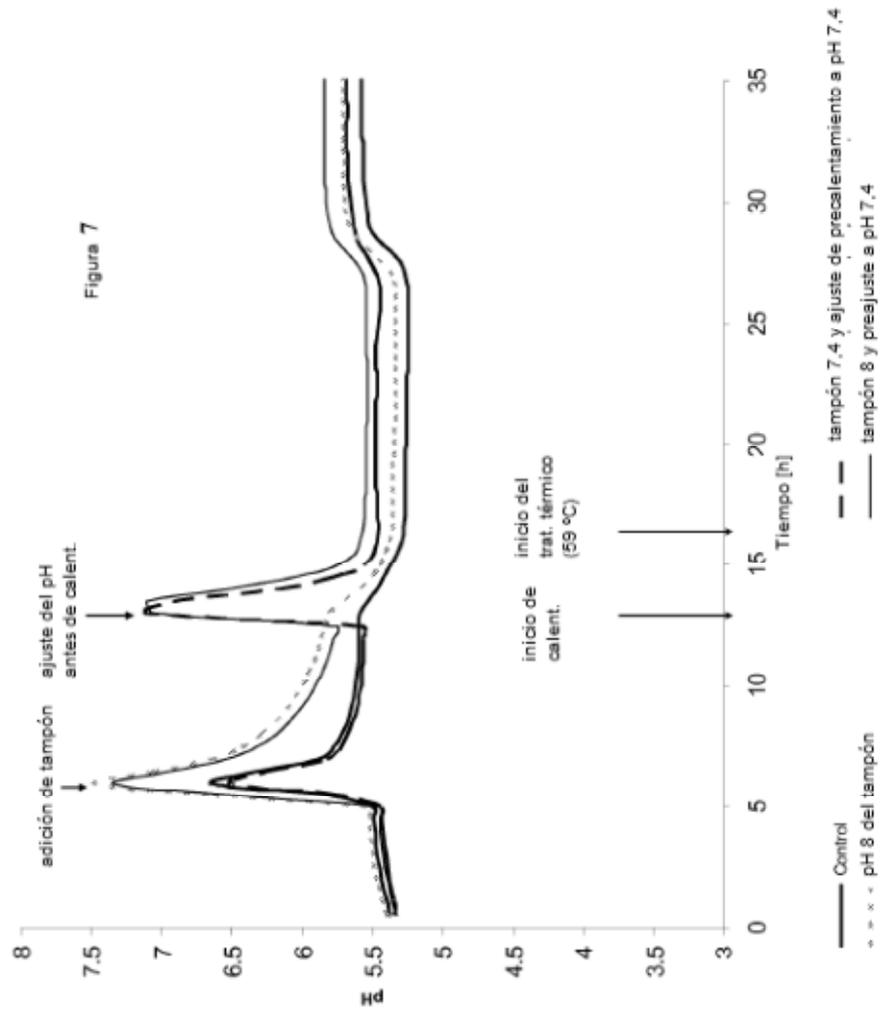


Figura 6



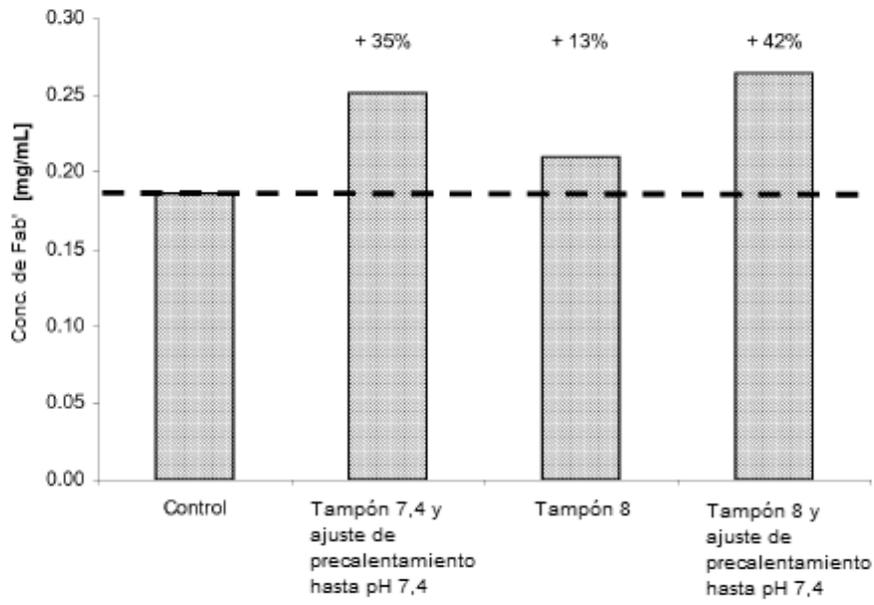


Figura 8

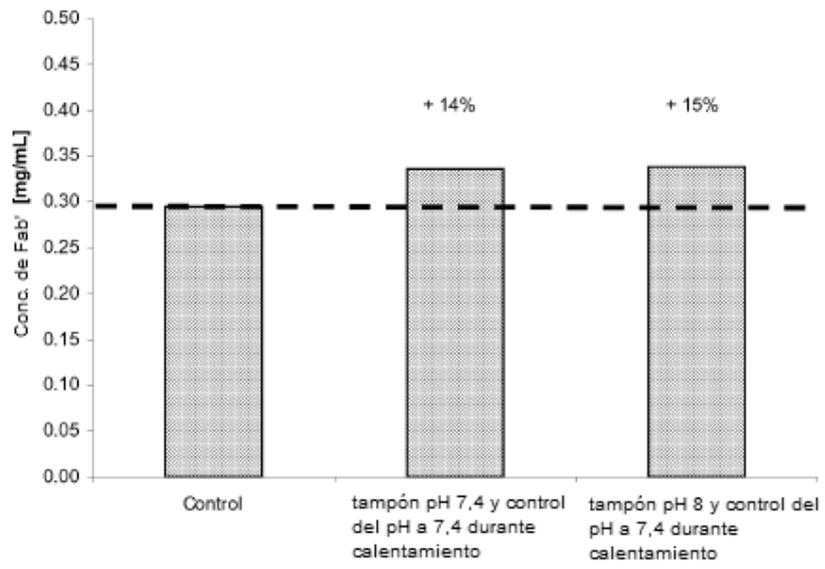


Figura 9

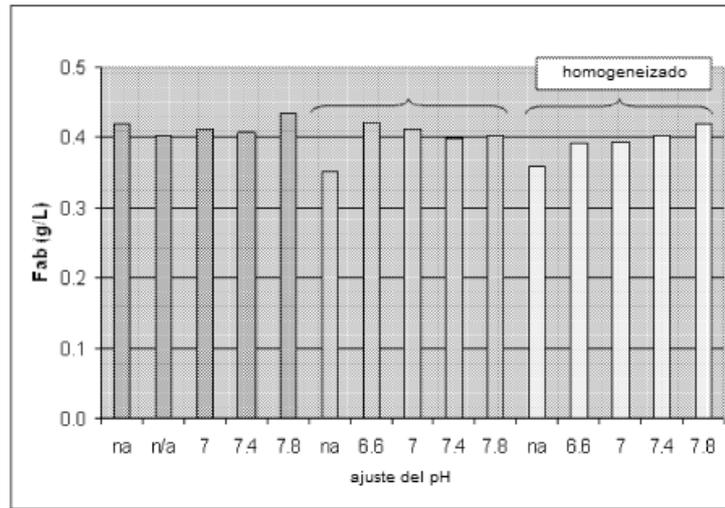


Figura 10

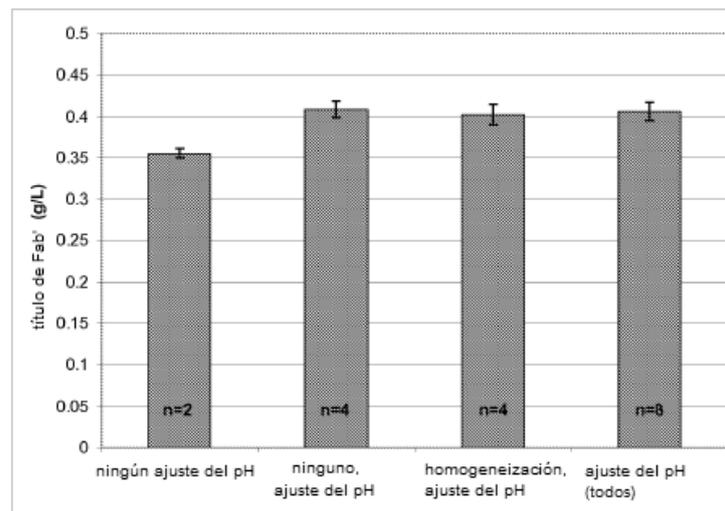


Figura 11