

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 424**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13713295 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2831261**

54 Título: **Procedimiento para producir proteínas recombinantes con bajos niveles de DHNA (1,4-dihidroxi-2-naftoato)**

30 Prioridad:

27.03.2012 US 201261616297 P

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LAIRD, MICHAEL W.;
ST. JOHN, RICHARD;
GUNSON, JANE V.;
KALEAS, KIM;
NADARAJAH, DEEPA;
ADAMS, RACHEL y
SNEDECOR, BRADLEY R.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 654 424 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

Procedimiento para producir proteínas recombinantes con bajos niveles de DHNA (1,4-dihidroxi-2-naftoato)

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos mejorados para cultivar proteínas recombinantes en células de *Escherichia coli* y, en particular, a la reducción de la cantidad de aducto de 1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA) y proteína recombinante.

10

Antecedentes de la invención

La purificación rentable y a gran escala de proteínas es necesaria para obtener productos biotecnológicos viables. En general, las proteínas se producen mediante cultivo celular, usando líneas de células de mamífero o bacterianas genomanipuladas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen de esa proteína. Puesto que las líneas celulares utilizadas son organismos vivos, se deben alimentar con un medio de crecimiento complejo que, en general, contiene una mezcla de sales, azúcares, aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y peptonas. La separación de la proteína deseada de la mezcla de compuestos suministrados a las células y de los subproductos de las propias células con una pureza suficiente para su uso como un fármaco para uso en humanos plantea un desafío formidable.

15

20

25

30

35

40

Las proteínas terapéuticas recombinantes se producen comúnmente en varias líneas celulares huésped que incluyen células huésped de mamíferos tales como, por ejemplo, mieloma murino NS0 y células de ovario de hámster chino (CHO) (Anderson, D. C. y Krummen, L. (2002) Curr. Opin. Biotech. 13: 117-123; Chu, L. y Robinson, D. K. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:180-187) y células huésped bacterianas que incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*). Cada una de las líneas celulares tiene ventajas y desventajas en términos de productividad y de las características de las proteínas producidas por las células. *Escherichia coli* se ha utilizado ampliamente para la producción a gran escala de proteínas terapéuticas, que no requieren una glucosilación compleja para presentar bioactividad. Las proteínas heterólogas expresadas por *E. coli* se pueden acumular como productos solubles o agregados insolubles. En general, para aislar las proteínas, las células se pueden someter a tratamientos para la extracción periplásmica o se pueden lisar para liberar productos intracelulares que, de otro modo, serían inaccesibles. Los avances en las técnicas de fermentación y cultivo celular han aumentado en gran medida los títulos de las proteínas recombinantes diana. Las opciones de líneas celulares de producción comercial compensan a menudo la necesidad de una alta productividad con la capacidad de proporcionar los atributos de calidad del producto requeridos para un producto determinado. En los procedimientos de fermentación según las prácticas correctas de producción actuales, la calidad está integrada en todo el procedimiento, garantizando que los requisitos de las autoridades sanitarias se cumplan en términos de seguridad, identidad de producto, calidad y pureza. Sin embargo, ocasionalmente surgen problemas en los que un producto determinado no cumple con sus especificaciones. El desafío consiste en desarrollar un procedimiento sólido que permita identificar y aislar el problema, para luego mitigar el problema de manera que los controles del procedimiento se puedan mantener dentro de los intervalos de parámetros establecidos y para garantizar que el procedimiento produzca de manera estable un producto que cumpla con las especificaciones del producto. Existe una necesidad en la técnica de mitigar o eliminar la incidencia de productos que no cumplen con las especificaciones.

45

Resumen de la invención

El procedimiento de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

50

55

60

La presente invención contempla un procedimiento para producir una proteína recombinante, que incluye péptidos, polipéptidos y anticuerpos, que comprende (a) fermentar una célula de *E. coli* en el que dicha célula de *E. coli* se ha transformado con un ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante, y (b) recolectar dicha proteína recombinante en condiciones en las que el oxígeno disuelto (dO_2) se mantiene en niveles superiores a un 0 % de manera continua durante las operaciones de recolección de la etapa (b), en el que las operaciones de recolección comprenden una etapa de homogeneización, y en el que dicho dO_2 se mantiene 1) antes de la homogeneización en niveles superiores a un 75 %; y/o 2) después de la homogeneización a aproximadamente un 50 % o en niveles superiores a un 50 %; y (c) purificar dicha proteína recombinante para obtener un material filtrado para almacenamiento (FBS), en el que dicho material filtrado no contiene cantidades detectables de aducto de 1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA) y proteína recombinante, medido mediante un ensayo de cromatografía de intercambio iónico (IEC) a 310 nm. En un modo de realización, en el procedimiento descrito anteriormente, el ensayo analítico se realiza por HPLC, RP HPLC, HIC HPLC, RMN, espectrometría de masas o espectroscopia UV.

En otro modo de realización, dicha proteína recombinante es un polipéptido recombinante o un anticuerpo aislado.

En otro modo de realización de la divulgación, la fermentación es independiente de la escala.

65

En un modo de realización de la invención, el dO_2 se mantiene durante un período igual o superior a 1,5 horas. En

otro modo de realización más, el dO_2 se mantiene durante un período igual o superior a 2 horas.

En un modo de realización, el dO_2 se mantiene con rociado o burbujeo de aire, con un aumento de la contrapresión o con agitación (es decir, mezclado). En un modo de realización, el aire rociado es de entre 0,4 vvm y 0,8 vvm. En otro modo de realización, el aire rociado es de 0,6 vvm. En otro modo de realización, la contrapresión incrementada es de entre 1,0 y 30 psi (6895 a 206 843 Pa). En un modo de realización, la contrapresión incrementada es de 19 psi (131 000 Pa). En otro modo de realización más, la velocidad de agitación es de entre 6 vatios/l y 8 vatios/l. En aún otro modo de realización más, la velocidad de agitación es de al menos 6 vatios/l. En otro modo de realización, la velocidad de agitación tiene como objetivo 6 vatios/l.

En un aspecto de la presente divulgación, como se define en la reivindicación 1, se contempla un procedimiento para producir una proteína recombinante que comprende (a) fermentar una célula huésped de *E. coli* con el gen *menE* eliminado en el que dicha célula huésped procarionta se ha transformado con un ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante, (b) recolectar dicha proteína recombinante; y (c) purificar dicha proteína recombinante a un FBS, en el que dicho material filtrado no contiene una cantidad detectable de aducto de DHNA y proteína recombinante, medido mediante un ensayo de IEC a 310 nm. Como un modo de realización adicional del procedimiento descrito anteriormente, el rendimiento de proteína recombinante se incrementa en aproximadamente un 20 % o más, en aproximadamente un 30 % o más, en aproximadamente un 40 % o más, en aproximadamente un 50 % o más, en aproximadamente un 60 % o más, en comparación con el rendimiento obtenido usando una célula huésped de *E. coli* de control.

En otro modo de realización de la divulgación, el rendimiento de proteína recombinante se incrementa en aproximadamente un 20 % o más, en aproximadamente un 30 % o más, en aproximadamente un 40 % o más, en aproximadamente un 50 % o más, en aproximadamente un 60 % o más, en comparación con el rendimiento obtenido usando una célula huésped de *E. coli* de control, en el que la fermentación es independiente de la escala.

En otro modo de realización de la divulgación, el rendimiento de proteína recombinante se incrementa en aproximadamente un 20 % o más, en aproximadamente un 30 % o más, en aproximadamente un 40 % o más, en aproximadamente un 50 % o más, en aproximadamente un 60 % o más, en comparación con el rendimiento obtenido usando una célula huésped de *E. coli* de control, en el que dicha proteína recombinante es un polipéptido recombinante o un anticuerpo aislado.

En otro modo de realización de la divulgación, el rendimiento de proteína recombinante se incrementa en aproximadamente un 20 % o más, en aproximadamente un 30 % o más, en aproximadamente un 40 % o más, en aproximadamente un 50 % o más, en aproximadamente un 60 % o más, en comparación con el rendimiento obtenido usando una célula huésped procarionta de control, en el que dicha célula huésped procarionta es *Escherichia coli* (*E. coli*).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados del ensayo COC de tres series de producción de un producto en el que dos series, serie 2 y serie 3, no cumplieron los resultados esperados para el ensayo COC. PW = agua purificada, C = serie de desarrollo de control, 1 = serie 1, 2 = serie 2 y 3 = serie 3.

La figura 2A muestra los espectros UV/vis (10 cm) para las series 1-3 en UV cercano, en la que se representan las series 1-3. Se observaron nuevos picos de absorbancia aproximadamente a 320 nm y a 460 nm que no fueron evidentes en la serie 1. La figura 2B muestra los espectros de UV/vis para la serie 3 menos la serie 1, en la que se puede distinguir la diferencia entre los picos de absorbancia de las series 2 y 3 y los de la serie 1.

La figura 3 muestra un ensayo de IEC monitorizado a 310 nm para las series 1-3. Se observó un ligero pico secundario detrás del pico principal en las series 2 y 3, mientras que el perfil de la serie 1 fue comparable al del material de referencia.

La figura 4 muestra un análisis por 2D-CL-EM de las series 1-3 intactas, monitorizadas a 280 nm y 310 nm. Se observó una masa esperada para la serie 1, mientras que se observó la masa esperada y una masa adicional a 157 Da para las series 2 y 3.

La figura 5 muestra un análisis por 2D-CL-EM e identificación de masa mediante un mapa peptídico tríptico con detección por EM de una fracción recogida del aducto marrón (se recogió un pico menor del ensayo de IEC). A partir del análisis por 2D-CL-EM, además de la masa esperada, se observó una masa de +156 Da para el pico secundario fraccionado.

La figura 6 muestra el análisis por CL-EM-EM del nuevo pico del aducto marrón observado a 48,8 minutos a 310 nm, que determinó que era un péptido T20 con Cys182 modificado con +154,006 Da. El péptido modificado (en la cisteína, +154,006 Da) y los péptidos T6 y T16 libres también se detectaron por extracción de masa.

La figura 7 compara los datos de HSQC de ¹H-¹⁵N del producto con los de un péptido sintético (NH₂-IVQCR-COOH) y mostró que faltaba una correlación Cys NH en la muestra del producto.

5 La figura 8 muestra la estructura propuesta confirmada por un fuerte nOe observado entre el CH de Cys y el NH de arginina.

Basándose en los datos de RMN recopilados, la estructura propuesta del aducto marrón se presenta en la figura 9.

10 La figura 10 muestra la ruta de biosíntesis para preparar menaquinonas en células procariotas.

La figura 11 muestra un producto recombinante filtrado representativo sometido a prueba para la formación de aductos marrones mediante cromatografía de intercambio iónico a 310 nm y no mostró formación de aducto medible.

15 La figura 12 muestra un esquema ejemplar de las mejoras en el procedimiento Hi-dO implementadas en las operaciones de recolección.

Descripción detallada de los modos de realización de la invención

I. Definiciones

20 A menos que se establezca de otro modo, se pretende que los siguientes términos y expresiones usados en el presente documento tengan los siguientes significados:

25 La expresión «velocidad de agitación» es la mezcla del caldo de cultivo o del homogeneizado, que se mide típicamente como revoluciones por minuto (rpm). En un modo de realización, la velocidad de agitación se puede medir mediante una «potencia por unidad de volumen». Por ejemplo, a 200 rpm en un fermentador de 1000 litros, la velocidad de agitación tiene un valor de aproximadamente 6 vatios/l.

30 El término «anticuerpo» en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. El término «anticuerpo», como se usa en el presente documento, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, en el que dichas dianas incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o de conejo.

45 Los «fragmentos de anticuerpo» comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o la región variable de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad), ECD (dominio extracelular) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen de forma inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

50 El «ensayo de claridad, opalescencia y coloración (COC)» se define como el uso de tubos de ensayo idénticos de vidrio incoloro, transparente y neutro con una base plana y un diámetro interno de 15-25 mm para comparar el líquido que se va a examinar con una suspensión de referencia recién preparada como se describe a continuación, siendo la profundidad de la capa de 40 mm. Las soluciones de color Estándar enumeradas en la Farmacopea de EE. UU. 2012 (USP Monograph 631, Color and Achromicity) o en la Farmacopea europea 5.0 (Procedimiento EP 2.2.2, Grado de coloración de líquidos) se pueden utilizar para confirmar la asignación de color adecuada.

60 La expresión «1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA)» es un producto químico derivado de células de *E. coli*. Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, et al. (2006) Gut 55: 681-8. El DHNA es un intermedio en la ruta de biosíntesis de la menaquinona (MK), también conocida como vitamina K₂, de células de *E. coli*. Neidhardt, F.C. (2010) Escherichia coli and Salmonella (versión en línea: Módulo 3.2.2 págs. 36-37); Inledew, W.J. & R.K. Poole (1984) The respiratory chains of Escherichia coli. Microbiological reviews. 48: 222-271; Nowicka, B. & J. Cruk (2010) Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. Biochimica et Biophysica Acta 1797: 1587-1605.

65 La expresión «oxígeno disuelto» (dO₂) es una medida relativa de la cantidad de oxígeno que se disuelve en o transporta un medio determinado. Se puede medir con una sonda de oxígeno disuelto, como un sensor de oxígeno

en un medio líquido.

El término «fermentar» o «fermentación», como se usa en el presente documento, significa el procedimiento de cultivo de células huésped procariontas que se han transformado para inducir la producción de una proteína recombinante de interés.

La expresión «material filtrado» o «sustancia filtrada (FBS)» significa la proteína recombinante del producto de interés después de la recolección y purificación, en el que la proteína se ha liberado de la célula huésped, se ha centrifugado y/o filtrado para eliminar cualquier resto celular, se ha purificado en columnas de cromatografía adecuadas y posteriormente se ha concentrado mediante un procedimiento de filtración.

La expresión «líquido de cultivo de células recolectadas», también denominado HCCF, significa líquido de cultivo de células procariontas o eucariotas del que se han eliminado las células, por medios que incluyen centrifugación o filtración. El cultivo celular es el procedimiento mediante el que las células procariontas o eucariotas se cultivan en condiciones controladas. La expresión «cultivo celular» se refiere al cultivo de células derivadas de eucariotas multicelulares, que incluyen células animales o procariontas monocelulares, que incluyen bacterias y levaduras. Los cultivos de células eucariotas incluyen células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino, hibridomas y células de insectos. Con un recipiente de cultivo celular apropiado, las proteínas secretadas se pueden obtener a partir de células dependientes de anclaje o líneas celulares en suspensión. Los cultivos celulares de mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) o células NS0.

La expresión «operaciones de recolección» o «recolección» significa, sin limitación, un procedimiento que comprende la lisis u homogeneización y, posteriormente, la centrifugación y/o filtración de un cultivo de células huésped procariontas fermentado que se ha transformado para producir una proteína recombinante de interés, con el fin de comenzar a aislar y purificar dicha proteína de interés.

El término «Hi-dO», como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento mejorado como se describe en el presente documento, que es el mantenimiento de un nivel de oxígeno disuelto superior a un 0 % durante las operaciones de recolección. Para lograr esto, se puede utilizar una combinación de aire rociado, contrapresión y velocidad de agitación para mantener el nivel de dO₂ en o por encima de un punto establecido, es decir, por encima de un 0 %, o entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 75 %, o en niveles superiores a un 75 %, o a aproximadamente un 50%, o en niveles superiores a un 50 %. En otro modo de realización, los expertos en la técnica también pueden hacer burbujear aire u oxígeno puro directamente en el caldo para alcanzar mediante Hi-dO unos niveles de oxígeno disuelto superiores a un 0 %.

El término «homogeneización», como se usa en el presente documento, significa un procedimiento de lisis o la lisis celular mecánica de células huésped procariontas transformadas con una proteína recombinante de interés con el fin de liberar dicha proteína de la célula huésped.

La expresión «contrapresión incrementada» se usa para incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno a través del caldo de cultivo. La contrapresión se mide normalmente en psi o bar.

Las «menaquinonas (MK)» son homólogos de la vitamina K₂ y sirven como moléculas transportadoras de electrones en la cadena respiratoria entre complejos proteicos unidos a membrana durante condiciones microaeróbicas y/o anaeróbicas. El término «*menE*» es un gen en la ruta de biosíntesis para preparar menaquinonas.

La expresión «fermentación microbiana» significa el cultivo celular de bacterias o levaduras genomanipuladas para producir proteínas y moléculas pequeñas (por ejemplo, metabolitos secundarios). La fermentación se utiliza para propagar bacterias y levaduras recombinantes, así como otros microorganismos y para producir proteínas de valor. La productividad celular y el crecimiento de estos organismos se maximizan suministrando medios de crecimiento particulares y controlando diversos factores ambientales (como el pH, la temperatura y la aireación). El líquido de fermentación bacteriana puede proceder de cultivos de *E. coli*.

La expresión «anticuerpo monoclonal», como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos, ya que se pueden sintetizar sin contaminarse con otros anticuerpos. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los «anticuerpos monoclonales» también se pueden aislar de

bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

5 La expresión «aire rociado» significa aire soplado desde la parte superior del fermentador que contiene el caldo de cultivo. Típicamente, se suministra oxígeno a un fermentador burbujando aire a través del medio de cultivo líquido, a menudo acompañado de una agitación vigorosa para efectuar una fina dispersión de burbujas.

10 La expresión «célula huésped procariota», como se usa en la presente divulgación, debería abarcar a aquellas que utilizan la ruta de biosíntesis de la menaquinona. Las células huésped procariotas abarcan, por ejemplo, *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En un aspecto de la divulgación se usan células gramnegativas. Las células de *E. coli* se usan como huésped para la invención (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2
15 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; n.º de depósito ATCC 27.325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lacIq lacL8* $\Delta ompT$ $\Delta (nmpC-fepE)$ *degP41* *kan^R* (patente de EE. UU. n.º 5.639.635). Por supuesto, otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli*_A 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass et al. (1990) Proteins, 8: 309-314. En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas tomando en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* se pueden usar adecuadamente como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón.
25

30 Como se usa en el presente documento, «proteína recombinante» se refiere en general a péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos. Dichas proteínas recombinantes son «heterólogas», es decir, exógenas a la célula huésped que se utiliza, tales como una proteína humana producida por *E. coli*. El polipéptido se puede producir como un agregado insoluble o como un polipéptido soluble en el espacio periplásmico o citoplasma.

35 La expresión «independiente de la escala» significa que la capacidad volumétrica del procedimiento de fermentación de la presente invención se puede lograr usando cualquier escala, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 litro o más, o aproximadamente 10 litros o más, o aproximadamente 100 litros o más, o aproximadamente 500 litros o más, o aproximadamente 1000 litros o más, o aproximadamente 10 000 litros o más, o aproximadamente 100 000 litros o más.

II. Modos para llevar a cabo la invención

40 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de producción recombinante de proteínas en un sistema de *E. coli*. La invención se basa en la prevención de la formación de un aducto marrón descubierta durante la producción de una proteína recombinante que causó que ciertos lotes del producto no cumplieran con las especificaciones. Como se ilustra en los ejemplos proporcionados en el presente documento, el problema del aducto marrón fue el resultado de un potencial de oxidorreducción incoherente durante las operaciones de recolección.
45 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que la formación del aducto marrón se puede evitar manteniendo un entorno con un nivel de oxígeno disuelto superior a cero durante las operaciones de recolección, como se define en la reivindicación 1 o, de forma alternativa, eliminando genéticamente el gen *menE* en el genoma de la célula huésped procariota utilizada para producir recombinantemente la proteína recombinante de interés.

50 **Producción recombinante de proteínas recombinantes en células procariotas**

En la primera etapa de los procedimientos anteriores, el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) utilizado para producir la proteína recombinante de interés se inserta adecuadamente en un vector replicable para expresión en la bacteria bajo el control de un promotor adecuado para bacterias. Para este fin existen
55 numerosos vectores disponibles, y la selección de un vector apropiado depende principalmente del tamaño del ácido nucleico que se va a insertar en el vector y de la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped particular con la que es compatible. Los componentes del vector para la transformación bacteriana pueden incluir una secuencia señal para el polipéptido heterólogo e incluirán una secuencia señal y también incluirán un promotor inducible para el polipéptido heterólogo. En general, también incluyen un origen de replicación y uno o más genes marcadores, descritos en el presente documento.
60

Si el polipéptido heterólogo se va a secretar, el ADN que codifica el polipéptido heterólogo de interés en el presente documento contiene una secuencia señal, tal como una en el extremo N del polipéptido heterólogo maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y
65

procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped bacterianas que no reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido heterólogo natural, la secuencia señal se sustituye por cualquier secuencia señal bacteriana comúnmente conocida.

5 Los vectores de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas.

10 Los vectores de expresión también contienen, en general, un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Típicamente, los genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y que, por tanto, sobreviven al régimen de selección.

20 El vector de expresión para producir un polipéptido heterólogo también contiene un promotor inducible que es reconocido por el organismo bacteriano huésped y está enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo de interés. También contiene un promotor inducible o de baja expresión basal independiente enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica las enzimas líticas. Los promotores inducibles adecuados para uso con huéspedes bacterianos incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa (Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)), el sistema promotor de arabinosa, que incluye el promotor araBAD (Guzman et al., J. Bacteriol., 174: 7716-7728 (1992); Guzman et al., J. Bacteriol., 177: 4121-4130 (1995); Siegele y Hu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8168-8172 (1997)), el promotor de ramnosa (Haldimann et al., J. Bacteriol., 180: 1277-1286 (1998)), el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980) y el documento EP 36.776), los promotores P.sub.LtetO-1 y P.sub.lac/are-1 (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res., 25: 1203-1210 (1997)), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983). No obstante, son adecuados otros promotores inducibles bacterianos conocidos y promotores de baja expresión basal. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo de este modo que un trabajador experto pueda unir las funcionalmente al ADN que codifica el polipéptido heterólogo de interés o a los ácidos nucleicos que codifican las enzimas líticas (Siebenlist et al., Cell, 20: 269 (1980)) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido. Si se usa un promotor fuerte y altamente permeable, tal como el promotor *trp*, en general se usa solo para la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo y no para el ácido nucleico que codifica las enzimas líticas. Los promotores *tac* y P_L se podrían usar para cualquiera, pero no para ambos. En un modo de realización, el promotor de fosfatasa alcalina (*phoA*) se usa para el producto y el promotor de arabinosa (*ara*) para las enzimas líticas.

45 Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen, en general, una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) enlazada de forma funcional al ADN que codifica el polipéptido heterólogo de interés. El promotor se puede eliminar del ADN fuente bacteriano mediante digestión con enzimas de restricción e insertar en el vector que contiene el ADN deseado. El promotor *phoA* se puede eliminar del ADN fuente bacteriano mediante digestión con enzimas de restricción e insertar en el vector que contiene el ADN deseado.

50 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de unión estándar comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se vuelven a unir en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

55 Las células huésped procariontas adecuadas para los procedimientos divulgados incluyen cualquiera que utilice la ruta de biosíntesis para preparar menaquinonas, como se define en el presente documento. Algunos ejemplos no limitantes pueden incluir, por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* y *Paracoccus*.

60 La transformación significa introducir ADN en el huésped procarionta de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa, en general, para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica usada es la electroporación.

65 Las células procariontas usadas para producir los polipéptidos se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo

Luria-Bertani (LB) más los suplementos nutritivos necesarios. En ciertos modos de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente la proliferación de células procariontas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a ampicilina. También se puede incluir cualquier complemento necesario, además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, en concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo.

Para la acumulación de un producto génico expresado, la célula huésped se cultiva en condiciones suficientes para la acumulación del producto génico. Dichas condiciones incluyen, por ejemplo, condiciones de temperatura, nutrientes y densidad celular que permitan la expresión y acumulación de proteínas por parte de la célula. Además, dichas condiciones son aquellas en las que la célula puede realizar las funciones celulares básicas de transcripción, traducción y paso de proteínas de un compartimento celular a otro para las proteínas secretadas, como conocen los expertos en la técnica.

Las células huésped procariontas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura típica varía entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 39 °C. En un modo de realización, la temperatura es de entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 37 °C. En otro modo de realización, la temperatura es de aproximadamente 30 °C.

El pH del medio de cultivo puede ser cualquier pH entre aproximadamente 5 y 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,4 o de aproximadamente 7,0.

Para la inducción, típicamente las células se cultivan hasta que se alcanza una cierta densidad óptica, por ejemplo, una A_{550} de aproximadamente 80-100, en cuyo punto se inicia la inducción (por ejemplo, mediante la adición de un inductor, mediante el agotamiento de un represor, supresor o componente de medio, etc.) para inducir la expresión del gen que codifica el polipéptido heterólogo.

Después de la acumulación del producto, opcionalmente antes de la recuperación del producto, el listado del caldo se incuba durante un período de tiempo suficiente para liberar el polipéptido heterólogo contenido en las células. En un modo de realización alternativo, o posterior al precedente, las células presentes en cultivo se pueden lisar mecánicamente usando cualquier medio mecánico conocido en la técnica, que puede incluir, por ejemplo, lisis química o choque osmótico con el fin de liberar dicha proteína de la célula huésped.

Una vez lisadas, el lisado u homogeneizado se puede transferir a un depósito de retención donde puede esperar la adición de más lotes de lisado/homogeneizado y/o donde puede ocurrir un procesamiento adicional como, por ejemplo, dilución con agua, adición de tampones o floculantes, ajuste del pH o alteración o mantenimiento de la temperatura del lisado/homogeneizado en preparación para las etapas de recuperación posteriores.

En una etapa posterior, el polipéptido heterólogo, como un producto soluble o insoluble liberado de la matriz celular, se recupera del lisado, u homogeneizado, de una manera que se minimice la corrección de restos celulares con el producto. La recuperación se puede realizar por cualquier medio, pero en un modo de realización, puede comprender la sedimentación de partículas refráctiles que contienen el polipéptido heterólogo o la recogida del sobrenadante que contiene el producto soluble. Un ejemplo de sedimentación es la centrifugación. En este caso, la recuperación tiene lugar, antes de la adsorción en lecho expandido (EBA) o la sedimentación, en presencia de un agente que perturba la pared celular externa para aumentar la permeabilidad y permite que se recuperen más sólidos. Ejemplos de dichos agentes incluyen un agente quelante tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o un zwitterión tal como, por ejemplo, un detergente iónico dipolar tal como el detergente ZWITTERGENT 316™. En un modo de realización, la recuperación tiene lugar en presencia de EDTA.

Si se usa la centrifugación para la recuperación, la fuerza centrífuga relativa (FCR) es un factor importante. La FCR se ajusta para minimizar la cosedimentación de los restos celulares con las partículas refráctiles liberadas de la pared celular en la lisis. La FCR específica usada para este propósito variará con, por ejemplo, el tipo de producto que se va a recuperar, pero es de al menos aproximadamente 3000 x g, más preferentemente de aproximadamente 3500-6000 x g, o aproximadamente 4000-6000 x g.

La duración de la centrifugación dependerá de varios factores. La velocidad de sedimentación dependerá, por ejemplo, del tamaño, la forma y la densidad de la partícula retráctil y la densidad y viscosidad del líquido. El tiempo de sedimentación para los sólidos dependerá, por ejemplo, de la distancia y velocidad de sedimentación. Es razonable esperar que las centrifugadoras de discos continuos funcionen bien para la recuperación de los agregados de polipéptidos heterólogos liberados o para la eliminación de restos celulares a gran escala, ya que estas centrifugadoras pueden procesar a altas velocidades de fluido debido a su fuerza centrífuga relativamente elevada y a la distancia de sedimentación relativamente pequeña.

El polipéptido heterólogo capturado en la etapa de recuperación inicial se puede purificar a continuación

adicionalmente para separarse de la proteína contaminante. En un modo de realización, el polipéptido heterólogo agregado se aísla, seguido de una solubilización y replegamiento simultáneos del polipéptido, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.288.931. De forma alternativa, el producto soluble se recupera mediante técnicas estándar como se describe a continuación.

Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, *Chromatography*, 5.ª edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Ámsterdam, Países Bajos, (1998); *Chromatography Today*, Poole, C. F. y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1991); *Scopes, Protein Purification Principles and Practice* (1982); Sambrook, J., et al. (ed), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados para el polipéptido heterólogo soluble liberado del periplasma o del citoplasma y son bien conocidos en la técnica: fraccionamiento en columnas de inmovoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex™ G-75.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en grandes cantidades mediante un procedimiento de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación por lote alimentado a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100 000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores de agitador para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferente). La fermentación a pequeña escala se refiere, en general, a la fermentación en un fermentador que no tiene más que aproximadamente 20 litros en capacidad volumétrica.

Como se analiza en el presente documento, la invención reivindicada se puede usar para producir proteínas recombinantes, que incluyen, por ejemplo, péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos.

Los ejemplos de péptidos y proteínas recombinantes que se pueden producir mediante el procedimiento de la invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana; hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α 1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; trombopoyetina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocina u orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (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 ; cardiotrofinas (factor de hipertrofia cardíaca), tal como cardiotrofina-1 (CT-1); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de proliferación y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; 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-13; anticuerpo anti-HER-2; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adreínas; proteínas reguladoras.

Los anticuerpos producidos por el procedimiento reivindicado pueden ser anticuerpos monoclonales que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un determinante antigénico particular (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un producto químico, un ácido nucleico o fragmentos de los mismos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (MAb) contra una diana de interés usando cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Köhler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al. (1983) *Immunology Today* 4:72) y la técnica del hibridoma de VEB (Cole et al. (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD y cualquier subclase de las mismas.

El hibridoma que produce los MAb se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (Teng et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-7312; Kozbor et al. (1983) Immunology Today 4:72-79; y Olsson et al. (1982) Methods in Enzymology 92:3-16).

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación (documento WO 94/04690; Suresh et al. (1986) Methods in Enzymology, 121:210; Rodrigues et al. (1993) J. of Immunology 151:6954-6961; Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167; Carter et al. (1995) J. of Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al. (1998) Nature Biotechnology 16:677-681. Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (Milstein et al. (1983) Nature 305:537-539; documento WO 93/08829; Traunecker et al. (1991) EMBO J. 10:3655-3659. Usando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para la conjugación como un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) en el tratamiento o prevención de la enfermedad como se define en el presente documento.

El anticuerpo, como se define, puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a células tumorales o a la matriz. A este respecto, «funcionalmente activo» significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de obtener anticuerpos anti-antiidiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del que procede el fragmento, derivado o análogo. De forma específica, en un modo de realización ejemplar, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede potenciar mediante la eliminación del marco y las secuencias de CDR que son C-terminales de la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, los péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR se pueden usar en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la técnica, por ejemplo, el ensayo BIA core (Kabat et al., (1991) en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a edición, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat et al. (1980) J. of Immunology 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos, tales como, pero no limitados a, fragmentos F(ab')₂, que contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Otros anticuerpos útiles son los dímeros de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tal como Fvs o anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.946.778; Bird (1988) Science 242:423-42; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Ward et al. (1989) Nature 334:544 - 54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en el extremo N o el extremo C, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, tal como una porción de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo de las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones proceden de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de regiones constantes de inmunoglobulina humana y monoclonal murina (patentes de EE. UU. n.º 4.816.567 y 4.816.397). Los anticuerpos quiméricos incluyen los anticuerpos «primatizados» que comprenden secuencias que se unen al dominio variable del antígeno, derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinante estándar (documento WO 87/02671; documento EP 184.187; documento EP 171.496; documento EP 173.494; documento WO 86/01533; patente de

EE. UU. n.º 4.816.567; documento EP 12023; Berter et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura et al. (1987) *Cancer. Res.* 47: 999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314: 446-449; y Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4: 214; patente de EE. UU. n.º 5.225.539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos que se pueden producir mediante los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289; patente de EE. UU. n.º 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico «C2B8» (patente de EE. UU. n.º 5.736.137); rituximab (RITUXAN®), ocrelizumab, una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 (patente de EE. UU. n.º 5.721.108; documento WO 04/056312) o tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al. (1993) *Chest*, 103:932, y documento WO 95/23865); anticuerpos dirigidos a otras interleucinas, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13; anticuerpos anti-VEGF que incluyen anticuerpos anti-VEGF madurados por afinidad y/o humanizados tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, Inc., Kim et al. (1992) *Growth Factors* 7: 53-64, documento WO 96/30046, documento WO 98/45331); anticuerpos anti-PSCA (documento WO 01/40309); anticuerpos anti-CD40, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento WO 00/75348); anti-CD11a (patente de EE. UU. n.º 5.622.700; documento WO 98/23761; Steppe et al. (1991) *Transplant Intl.* 4:3-7; Hourmant et al. (1994) *Transplantation* 58:377-380); anti-IgE (Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2623-2632; documento WO 95/19181); anti-CD18 (patente de EE. UU. n.º 5.622.700; documento WO 97/26912); anti-IgE, que incluye E25, E26 y E27 (patentes de EE. UU. n.º 5.714.338; 5.091.313; documento WO 93/04173; patente de EE. UU. n.º 5.714.338); anticuerpo antirreceptor Apo-2 (documento WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF-alfa que incluyen cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (patente de EE. UU. n.º 5.672.347; Lorenz et al. (1996) *J. Immunol.* 156(4): 1646-1653; Dhainaut et al. (1995) *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469); anticuerpo antitromboplastina tisular (TF) (documento EP 0 420 937 B1); anticuerpo antiintegrina humana alfa 4 beta 7 (documento WO 98/06248); anti-EGFR, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado (documento WO 96/40210); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (patente de EE. UU. n.º 4.515.893); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 SIMULECT® y ZENAPAX® (patente de EE. UU. n.º 5.693.762); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al. (1996) *Arthritis Rheum* 39(1): 52-56); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-337); anticuerpos antirreceptor Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra FcγRI como en Graziano et al. (1995) *J. Immunol.* 155(10): 4996-5002; anticuerpos antiantígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey et al. (1995) *Cancer Res.* 55(23 Suppl): 5935s-5945s; anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama que incluyen huBrE-3, hu-Mc3 y CHL6 (Ceriani et al. (1995) *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s; y Richman et al. (1995) *Cancer Res.* 55(23 Suppl): 5916s-5920s); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton et al. (1996) *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis et al. (1995) *J. Immunol.* 155(2): 925-937); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic et al. (1995) *Cancer Res* 55(23 Suppl): 5908s-5910s y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid et al. (1995) *Cancer Res* 55(23 Suppl): 5899s-5907s); 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 antihepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B (OSTAVIR®); anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo del epítipo GD3 antiidiotípico BEC2; anticuerpo dirigido contra carcinoma de células renales humanas tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo dirigido contra tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo dirigido contra melanoma humano R24 dirigido contra gangliósido GD3; anticuerpo dirigido contra carcinoma de células escamosas humanas (SF-25); y anticuerpos antiantígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

III. Procedimientos y ensayos

Procedimientos/ensayos analíticos

Ensayo de claridad, opalescencia y coloración (COC)

El grado de opalescencia también se puede determinar mediante medición instrumental de la luz absorbida o dispersada a causa de la falta de homogeneidad de densidad óptica submicroscópica de soluciones y suspensiones opalescentes. Dichas técnicas son la nefelometría y la turbidimetría. Para la medición de turbidez de muestras coloreadas, se utilizan la turbidimetría en modo ratio y la nefelometría con selección de ratio. El efecto de dispersión de la luz de las partículas en suspensión se puede medir mediante observación de la luz transmitida (turbidimetría) o la luz dispersada (nefelometría). La turbidimetría en modo ratio combina los principios de la nefelometría y la turbidimetría. La turbidimetría y la nefelometría son útiles para la medición de suspensiones ligeramente opalescentes. Se deben usar suspensiones de referencia producidas en condiciones bien definidas. Las soluciones de color estándar enumeradas en la Farmacopea de EE. UU. 2012 (USP Monograph 631, Color and Achromicity) o en la Farmacopea europea 5.0 (Procedimiento EP 2.2.2, Grado de coloración de líquidos) se pueden utilizar para confirmar la asignación de color adecuada. Para mediciones cuantitativas, la construcción de curvas de calibración es esencial, ya que la relación entre las propiedades ópticas de la suspensión y la concentración de la fase dispersa

es, en el mejor de los casos, semiempírica. La determinación de la opalescencia de líquidos coloreados se realiza con turbidímetros en modo ratio o con nefelómetros con selección de ratio, ya que el color proporciona una interferencia negativa, atenúa tanto la luz incidente como la dispersada y reduce el valor de turbidez. El efecto es tan grande incluso para muestras moderadamente coloreadas que no se pueden usar los nefelómetros convencionales. La evaluación instrumental de la claridad y la opalescencia proporciona una prueba más discriminatoria que no depende de la agudeza visual del analista. Los resultados numéricos son más útiles para la monitorización de la calidad y el control del procedimiento, especialmente en estudios de estabilidad. Por ejemplo, se pueden proyectar datos numéricos previos sobre estabilidad para determinar si un lote determinado de formulación de dosificación o un principio activo excederán los límites de vida útil antes de la fecha de caducidad.

Ensayo de HPLC

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento, también conocida como cromatografía de líquidos a alta presión, abreviada como HPLC, es una forma especial de cromatografía de líquidos y hoy en día se usa con frecuencia en bioquímica y química analítica. El analito es forzado a pasar a través de una columna de la fase estacionaria en un líquido (fase móvil) a alta presión, lo que disminuye el tiempo que permanecen los componentes separados en la fase estacionaria y, por lo tanto, el tiempo que tienen para difundirse dentro de la columna. Esto conduce a picos más estrechos en el cromatograma resultante y, por consiguiente, a una mayor resolución y sensibilidad en comparación con la CL. La fase móvil se elige para garantizar la solubilidad de los solutos de muestra. Para la fase estacionaria se usa preferentemente sílice microparticulada (no modificada o químicamente modificada), debido a que su elevada área superficial acentúa las diferencias en las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria. El uso de una fase estacionaria que interactúa fuertemente con los solutos con respecto a las interacciones entre la fase móvil y el soluto dará como resultado unos tiempos de retención muy largos, una situación que no es analíticamente útil. Por lo tanto, la fase estacionaria se debe seleccionar para que proporcione interacciones de solutos de débiles a moderadas con respecto a las de la fase móvil. Como consecuencia, la naturaleza del soluto determina el tipo de CL seleccionada. Las interacciones más fuertes deben ocurrir en la fase móvil para garantizar la solubilidad de la muestra y una buena elución, mientras que la fase estacionaria debe responder a diferencias más sutiles entre los solutos. Por ejemplo, los compuestos polares neutros se analizan en general mejor usando una fase móvil polar junto con una fase estacionaria no polar que distingue diferencias sutiles en el carácter dispersivo de los solutos. Uno de los aspectos poderosos del HPLC es que la fase móvil se puede variar para alterar el mecanismo de retención. Se pueden añadir modificadores a la fase móvil para controlar la retención. Por ejemplo, el pH es una variable importante en las fases móviles acuosas.

La cromatografía en fase inversa (RP-HPLC) requiere el uso de una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar (compuesta de uno o más de los disolventes polares, por ejemplo, agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano).

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)-HPLC: Este procedimiento cromatográfico es bueno para analizar proteínas o bioconjugados anticuerpo-proteína en función de su hidrofobicidad. La teoría en la que se basa la cromatografía de interacción hidrófoba es que las proteínas se unen a la resina empleando una fase móvil acuosa con alto contenido de sal. Las condiciones de sal contribuyen a un efecto liotrópico que permite que las proteínas se unan a la cobertura de la superficie inferior de un ligando hidrófobo. Las proteínas se eluyen mediante la técnica simple de disminuir la concentración de sal. La mayoría de las dianas terapéuticas se eluyen en un tampón con bajo contenido en sal o sin sal. Por lo tanto, el compuesto se puede eluir en un entorno más polar y menos desnaturante. Por ejemplo, la HIC se ha usado ampliamente para analizar la carga de fármaco en conjugados anticuerpo-fármaco o proteína-fármaco.

Ensayo de RMN

La detección por resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en el hecho de que ciertos núcleos con masas impares, incluyendo el H y el ^{13}C , giran alrededor de un eje de forma aleatoria. Sin embargo, cuando se colocan entre los polos de un imán fuerte, los giros se alinean ya sea de forma paralela o antiparalela al campo magnético, estando orientación paralela favorecida por tener una energía ligeramente más baja. Los núcleos se irradian entonces con radiación electromagnética que es absorbida y que coloca los núcleos paralelos en un estado de energía superior; en consecuencia, ahora están en «resonancia» con la radiación. Cada H o C producirán diferentes espectros dependiendo de su ubicación y de las moléculas adyacentes, o de los elementos del compuesto, ya que todos los núcleos de las moléculas están rodeados por nubes de electrones que cambian el campo magnético circundante y, por lo tanto, alteran la frecuencia de absorción.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir la relación masa-carga (m/z o m/q) de iones. En general, se usa para analizar la composición de una muestra física al generar un espectro de masas que representa las masas de los componentes de la muestra. La técnica tiene varias aplicaciones que incluyen identificar compuestos desconocidos por la masa del compuesto y/o de fragmentos de los mismos, determinar la composición isotópica de uno o más elementos de un compuesto, determinar la estructura de los compuestos mediante la observación de la fragmentación del compuesto, cuantificar la cantidad de un compuesto en una muestra utilizando

procedimientos cuidadosamente diseñados (la espectrometría de masas no es intrínsecamente cuantitativa), estudiar los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y de partículas neutras en vacío) y determinar otras propiedades físicas, químicas o incluso biológicas de compuestos con una variedad de otros enfoques.

Un espectrómetro de masas es un dispositivo utilizado para la espectrometría de masas, y produce un espectro de masas de una muestra para analizar su composición. Esto se logra normalmente ionizando la muestra y separando iones de diferentes masas y registrando su abundancia relativa mediante la medición de las intensidades del flujo de iones. Un espectrómetro de masas típico comprende tres partes: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector.

El tipo de fuente de iones es un factor contribuyente que influye enormemente en el tipo de muestras que se pueden analizar mediante espectrometría de masas. La ionización de electrones y la ionización química se utilizan para gases y vapores. En las fuentes de ionización química, el analito se ioniza mediante reacciones químicas ion-molécula durante las colisiones en la fuente. Dos técnicas utilizadas a menudo con muestras biológicas líquidas y sólidas incluyen la ionización por electronebulización (ESI) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Otras técnicas incluyen bombardeo atómico rápido (FAB), termonebulización, ionización química a presión atmosférica (APCI), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) e ionización térmica.

Espectroscopia UV

Espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis o UV/Vis) se refiere a la espectroscopia de absorción o espectroscopia de reflectancia en la región espectral del ultravioleta-visible. Esto significa que usa luz en los intervalos visible y adyacente (UV cercano e infrarrojo cercano (NIR)). La absorción o reflectancia en el intervalo visible afecta directamente el color percibido de los productos químicos involucrados. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas experimentan transiciones electrónicas. Esta técnica es complementaria a la espectroscopia de fluorescencia, ya que la fluorescencia se ocupa de las transiciones desde el estado excitado hasta el estado fundamental, mientras que la absorción mide las transiciones desde el estado fundamental hasta el estado excitado. Un espectrómetro UV es un instrumento que utiliza un haz de luz procedente de una fuente de luz visible y/o UV (color rojo) que se separa en sus longitudes de onda componentes mediante un prisma o rejilla de difracción. Cada haz monocromático (longitud de onda única) a su vez se divide en dos haces de igual intensidad mediante un dispositivo semirreflejado. Un haz, el haz de muestra (color magenta), pasa a través de un pequeño contenedor (cubeta) transparente que contiene una solución del compuesto estudiado en un disolvente transparente. El otro haz, la referencia (color azul), pasa a través de una cubeta idéntica que contiene solo el disolvente. Las intensidades de estos haces de luz se miden luego mediante detectores electrónicos y se comparan. La intensidad del haz de referencia, que debería haber sufrido poca o ninguna absorción de luz, se define como I₀. La intensidad del haz de muestra se define como I. Durante un corto período de tiempo, el espectrómetro escanea automáticamente todas las longitudes de onda componentes de la manera descrita. La región ultravioleta (UV) escaneada es normalmente de 200 a 400 nm, y la parte visible es de 400 a 800 nm.

IV. Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de aducto

Durante la producción de una proteína recombinante particular se produjeron siete materiales filtrados para almacenamiento (FBS); de ellos, se obtuvieron resultados típicos contra los criterios de aspecto del producto para cinco de los siete materiales. Según la especificación de producción, las instrucciones de prueba específicas del producto requieren el uso de series de color Amarillo (Y) para la evaluación de las muestras del producto mediante el ensayo COC, un procedimiento para la determinación de la claridad/grado de opalescencia, grado de coloración y aspecto. Sin embargo, dos materiales (series 2 y 3) eran de color marrón y no cumplían con el criterio de color de serie Amarillo esperado de $\leq Y7$ para el ensayo de COC. Una comparación de los resultados de COC para las series 1-3 se muestra en la figura 1. Para investigar adicionalmente la discrepancia, las siete muestras de FBS se concentraron para aumentar la intensidad del color. Las muestras concentradas se compararon con todas las soluciones de color estándar enumeradas en la Farmacopea de EE. UU. 2012 (USP Monograph 631, Color and Achromicity) o en la Farmacopea europea 5.0 (Procedimiento EP 2.2.2, Grado de coloración de líquidos) para confirmar la asignación de color adecuada. Las muestras se compararon bajo luz diurna difusa durante 5 minutos después de la preparación de la muestra de referencia, mirando verticalmente sobre un fondo negro. La difusión de la luz debe ser tal que la muestra de referencia I se pueda distinguir fácilmente del agua y que la suspensión de referencia II se pueda distinguir fácilmente de la suspensión de referencia I. Se consideró que un líquido era transparente si su claridad era la misma que la del agua R o la del disolvente utilizado cuando se examinó en las condiciones descritas anteriormente, o si su opalescencia no fue más pronunciada que la de la muestra de referencia I.

Dado que la causa de la coloración era desconocida para las series 2 y 3, se completaron múltiples estudios de investigación para determinar la fuente y la causa del color marrón atípico. Las muestras de las series 1-3 se analizaron en busca de metales, oligoelementos (que no sean metales) y cromóforos. Estos estudios sugirieron que

la coloración observada en las series 2 y 3 no se debió a la presencia de metales u otros oligoelementos (datos no mostrados).

5 Para determinar si los cromóforos se asociaron con el color inesperado observado en los FBS, las series 1-3 se analizaron usando espectroscopia ultravioleta y visible (UV/vis) con una cubeta de 1 cm de recorrido óptico. Los espectros UV (200-600 nm) no mostraron diferencias significativas en el perfil de observancia para las muestras analizadas.

10 Para aumentar la sensibilidad del espectrofotómetro UV, el experimento se repitió usando una cubeta de 10 cm de recorrido óptico. La cubeta de 10 cm ofrece una mayor sensibilidad que la cubeta de 1 cm debido a que la absorbancia de una muestra es proporcional al número de moléculas absorbentes presentes en el haz de luz del espectrofotómetro. Las muestras se escanearon entre 200 y 700 nm para determinar el espectro de absorción de las series 1-3. La forma de los espectros para las series 2 y 3 fue diferente a la de la serie 1: se observaron nuevos picos de absorbancia aproximadamente a 320 nm y a 460 nm que no fueron evidentes en la serie 1 (figura 2A). Esta diferencia se puede observar más claramente cuando el espectro de la serie 1 se resta del espectro de la serie 3 (figura 2B). El pico observado a 460 nm para las series 2 y 3 es coherente con un perfil de flavina (por ejemplo, vitamina).

20 A partir de los resultados de UV/vis de la cubeta de 10 cm se realizó un análisis de espectro completo para RP-HPLC e IEC con opciones para detección por EM en los FBS de las series 1-3.

25 Usando la detección de espectro completo para RP-HPLC, no se observaron diferencias cromatográficas para las series 1-3 (datos no mostrados). Sin embargo, se observaron diferencias menores para IEC a 310 nm. Como se muestra en la figura 3, se observa un ligero pico detrás del pico principal para las series 2 y 3, mientras que el perfil de la serie 1 es comparable al material de referencia.

30 Las muestras intactas se enviaron para 2D-CL-EM y se monitorizaron a 280 y 310 nm. El análisis por 2D-CL-EM consiste en dos partes: la primera dimensión es la separación mediante RP-HPLC con la segunda dimensión como picos fraccionados para el análisis por espectrometría de masas. A partir de este experimento se observó la masa esperada para la serie 1, mientras que se observó la masa esperada y una masa adicional de aproximadamente +157 Da para las series 2 y 3 (figura 4).

Ejemplo 2: Explicación del aducto

35 Para dilucidar mejor el aducto, se seleccionó la serie 3 para el fraccionamiento (se recolectó el pico menor del ensayo IEC (figura 3)) y se analizó adicionalmente mediante 2D-CL-EM e identificación de masas mediante un mapa peptídico tríptico con detección por EM.

40 A partir del análisis por 2D-CL-EM (figura 5), además de la masa esperada, se observó de nuevo un aumento de la masa de aproximadamente +156 Da para el pico secundario fraccionado. Tras la reducción en línea (con DTT) de la muestra, se observó la masa reducida esperada. Los cuatro Dalton adicionales observados entre los análisis reducidos y naturales se deben a la rotura de los enlaces disulfuro y la adición de cuatro hidrógenos. La masa adicional se observó nuevamente, lo que sugiere que la modificación fue no reversible o covalente.

45 A partir del mapa peptídico tríptico, la muestra se recogió a 214 nm y a 310 nm. Como se muestra en la figura 6, los nuevos picos se potencian en la región de 45-55 minutos. El análisis por CL-EM-EM del nuevo pico observado a 48,8 minutos a 310 nm determinó que era un péptido T20 con el residuo de cisteína modificado con +154,006 Da. El péptido modificado (en la cisteína, +154,006 Da) y los péptidos T6 y T16 libres también se detectaron por extracción de masa. El T21 reducido o T21 modificado no se detectaron, pero esto se puede deber a los bajos niveles presentes. Los otros dos picos observados eluyendo entre 50 y 56 minutos a 310 nm no contenían ninguna especie única en comparación con la referencia.

50 Se recogió el análisis 1H-RMN 1D y 2D para determinar la estructura del aducto. Se adquirieron datos adicionales usando TOSCY (espectroscopia de correlación total), HSQC (coherencia cuántica simple heteronuclear), HMBC (correlación de enlace múltiple heteronuclear) y ROESY (espectroscopia de efecto Overhauser en marco rotatorio (nOe)).

60 TOCSY crea correlaciones entre todos los protones que están acoplados entre sí y con todos los demás protones dentro de un sistema de espín dado. El experimento HSQC correlaciona los cambios químicos de los núcleos directamente unidos (es decir, dos tipos de núcleos químicos) mientras que el experimento HMBC correlaciona los desplazamientos químicos de dos tipos de núcleos separados entre sí por dos o más enlaces químicos. ROESY utiliza nOe que utiliza el espacio, no a través de enlaces químicos para confirmar una conformación molecular precisa (es decir, estructura tridimensional de una molécula). El péptido recolectado observó un acoplamiento de largo alcance 1H-13C entre protones aromáticos (quinona) y C=O a 182 ppm. Los desplazamientos químicos de HSQC de 1H-13C para el péptido recolectado en la región aromática son muy similares a los observados para el compuesto modelo sintético unido a naftaleno-1,4-diona. Los datos TOCSY asignan las resonancias Q, V y R del

producto. La comparación de los datos de HSQC de ¹H-¹⁵N del producto con los de un péptido sintético (NH₂ - IVQCR-COOH) mostró que faltaba una correlación Cys NH en la muestra de producto, como se muestra en la figura 7. La estructura propuesta se confirma por un fuerte nOe observado entre el CH de Cys y el NH de Arg (figura 8). Basándose en los datos de RMN recopilados, la estructura propuesta se presenta en la figura 9.

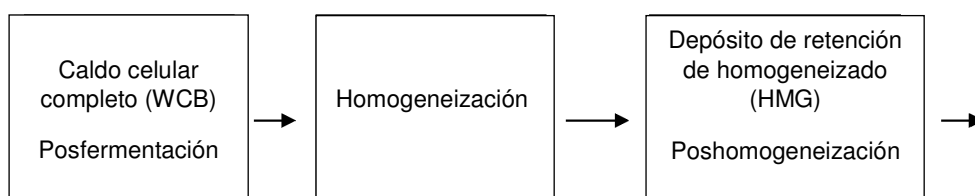
La identificación de la especie coloreada como 1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA) que formó el aducto marrón de proteína recombinante se basó en los datos de EM, RMN y genéticos. Los datos de RMN confirmaron que el DHNA estaba unido a la proteína recombinante a través de residuos de cisteína. El DHNA es un producto derivado de la ruta de biosíntesis de menaquinona de células de *E. coli* (figura 10). La menaquinona está presente en *E. coli*, pero su producción aumenta cuando el cultivo está en condiciones anaeróbicas y/o microaeróbicas. La menaquinona se usa para el transporte de electrones en entornos con oxígeno limitado y se usa para devolver el enlace disulfuro que forma la proteína DsbB al estado oxidado activo en condiciones anaeróbicas (microaeróbicas).

Ejemplo 3: Ejemplo del procedimiento Hi-dO para mitigar la formación de aducto de DHNA y producto

Se desarrolló una estrategia de control para evitar la generación de tioles libres de un producto y la posterior formación del aducto de DHNA y producto. Se determinó que la causa de la formación de color era el resultado de un entorno con potencial de oxidorreducción bajo durante las operaciones de recolección, ya que las series 2 y 3 exhibían los títulos y las densidades celulares más altos, ambas se sometieron a tiempos de retención más largos para sus homogeneizados diluidos, se requirieron duraciones más prolongadas para que los homogeneizados alcanzaran una temperatura inferior a la temperatura objetivo de 15 °C y tenían tiempos y velocidades de mezcla del homogeneizado por debajo del nivel óptimo (datos no mostrados). Estos factores contribuyeron a generar un entorno de bajo nivel de oxígeno que promovió la reducción de los enlaces disulfuro del producto y proporcionó la oportunidad de que el DHNA se uniera a los tioles libres del producto proteico.

Dado que el aducto de DHNA y proteína se formó durante el entorno con potencial de oxidorreducción bajo durante las operaciones de recolección que condujeron a un reducido número de enlaces disulfuro (es decir, tioles libres), se desarrolló un enfoque para evitar la generación de tioles libres y la formación del aducto de DHNA y producto. Este control mejorado del procedimiento llamado Hi-dO, mantiene los niveles de oxígeno disuelto en las operaciones de recolección por encima de cero (> 0 %) para eliminar el entorno reductor (es decir, no generación de tioles libres).

La formación del aducto de DHNA y producto es una reacción biológica compleja que requiere la combinación de múltiples eventos en las operaciones de fermentación y recolección. El resultado del procedimiento de fermentación es la producción de niveles y/o disponibilidad considerables de DHNA. El siguiente esquema muestra las tres etapas principales de una operación de recolección típica: etapa de posfermentación, una etapa de homogeneización, luego una etapa de poshomogeneización.



Varias etapas del procedimiento se sometieron a prueba posfermentación/prehomogeneización y se sometieron a prueba poshomogeneización para determinar si dichas acciones mitigarían el entorno reductor o la generación de tioles libres. Dichas mejoras en el procedimiento sometidas a prueba se muestran en la tabla 1 y la figura 12.

Tabla 1. Mejoras en el procedimiento (Hi-dO)

Posfermentación / Prehomogeneización	En depósito de retención HMG / Poshomogeneización
Iniciar el control del procedimiento Hi-dO de WCB: 1. dO ₂ objetivo > 75 % 2. Aumentar la velocidad de agitación (6,3 vatios/l) 3. Aplicar aire rociado (0,6 vvm) 4. Añadir contrapresión hasta aproximadamente 18,85 psi (1,3 bar) 5. Tiempo del procedimiento = 1,5 horas	Diluir el homogeneizado con 2 x agua antes de transferir el homogeneizado 1. Control de temperatura a 10 °C 2. dO ₂ objetivo > 50 % aumentando el rociado y/o burbujeo de aire

Posfermentación / Prehomogeneización	En depósito de retención HMG / Poshomogeneización
	Transferir el homogeneizado en agua para una dilución inmediata
	<p>Iniciar el control del procedimiento de homogeneizado Hi-dO₂:</p> <p>6. Mantener el dO₂ objetivo > 50 %</p> <p>7. Aumentar la agitación (1-6 vatios/l)</p> <p>8. Aplicar aire rociado o burbujeadado (si es necesario)</p> <p>9. Tiempo del procedimiento = 2 horas</p>

Los resultados de las mejoras en el procedimiento descritas en la tabla 1 y la figura 12 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

5 Análisis de calidad del producto de las series de desarrollo realizadas con los controles de procedimiento mejorado Hi-dO

Serie de fermentación	IEC % de pico anómalo a 280/310 nm	IEC % de pico principal a 280 nm	RP-HPLC % de pico A	SEC % de monómero	SEC natural % de monómero
Pequeña escala (10 l) n.º 1	0,00/0,00	99,48	98,82	100,00	99,99
Pequeña escala (10 l) n.º 2	0,00/0,00	99,69	99,00	100,00	99,97
Escala de producción (1000 l)	0,00/0,00	99,58	99,03	100,00	99,99
FBS espec. liberado CofA	No definido, pero no debería ser detectable	≥ 97 % de pico principal	≥ 97 % de pico A	≥ 98 % de monómero	≥ 98 % de monómero

10 Se llevó a cabo un análisis de causa raíz para comprender los orígenes de la coloración marrón. Este análisis resultó en la identificación de las especies coloreadas (DHNA), su unión a un producto de proteína recombinante, la estructura del aducto (DHNA-proteína), su origen y el mecanismo propuesto de cómo y cuándo el DHNA se unió al producto durante el procedimiento de producción. Como se resume en la tabla 1, se implementó una estrategia de mitigación para prevenir la formación del aducto marrón, manteniendo el nivel de oxígeno disuelto por encima de cero (> 0 %) durante las operaciones de recolección para eliminar el entorno reductor y prevenir la formación de tioles libres de producto. Como resultado, como se muestra por los análisis por IEC y como demostró el 0 % de pico anómalo, la formación de aducto marrón no se detectó en el FBS (tabla 2).

20 **Ejemplo 4: Generación de células huésped de *E. coli* con el gen *menE* eliminado**

(no reivindicado *per se*)

Además del procedimiento de recolección Hi-dO de la invención, se emprendió otro enfoque para mitigar la formación de aductos marrones. Esto implicó la genomaniplación de la célula huésped procarionta de modo que el gen *menE* se eliminó del genoma, evitando de ese modo la producción de cualquier intermedio de DHNA a partir de la ruta de biosíntesis de la menaquinona que se pudiera unir al producto recombinante.

Las células huésped con el gen *menE* eliminado se generaron como un mutante inactivado monogénico dentro del marco, siguiendo los procedimientos descritos en Baba et al. Construction of *E. coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Molecular Systems Biology, vol. 21, p.1-10 (2006). El gen *menE* se seleccionó para mutagénesis con productos de PCR que contienen un casete de resistencia (como kanamicina) flanqueado por sitios diana de reconocimiento de FLP y una homología de 50 pares de bases con las secuencias cromosómicas adyacentes.

35 La mutagénesis produjo aproximadamente 10-1000 colonias de resistencia a la kanamicina cuando las células huésped se incubaron aeróbicamente a 37 °C en agar de caldo Luria-Bertani (LB) que contenía 30 µg/ml de

kanamicina.

Ejemplo 5: Producción de proteínas recombinantes utilizando células huésped de *E. coli* con el gen *menE* eliminado

5 (no reivindicado *per se*)

10 Se sometió a prueba la capacidad de las células huésped de *E. coli* con el gen *menE* eliminado de producir proteína recombinante que no exhibiera aducto de proteína asociada a DHNA. Brevemente, las células de *E. coli* con el gen *menE* eliminado se transformaron con constructos de plásmidos que codificaban para dos proteínas recombinantes, PROT1 y PROT2, y dos anticuerpos recombinantes, AB1 y AB2, según técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Simmons et al., Expression of full-length immunoglobulins in *E. coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies, J of Immunol Methods 263 p. 133-147 (2002)). La fermentación de las cuatro proteínas/anticuerpos recombinantes se desarrolló como se describe en el presente documento (véase también el documento US 6.979.556).

15 El producto recombinante filtrado para las cuatro proteínas/anticuerpos recombinantes se sometió a prueba para la formación de aducto de DHNA y proteína mediante un ensayo de IEC a 310 nm y no mostró formación de aducto de DHNA y proteína detectable (véase la figura 11 para resultados ejemplares para PROT 1).

20 Sorprendentemente, se descubrió que el rendimiento del producto recombinante como resultado del uso de células de *E. coli* con el gen *menE* eliminado aumentó de forma apreciable en aproximadamente un 20 % a un 50 % en comparación con el rendimiento obtenido usando células huésped de *E. coli* con un gen *menE* intacto natural. La tabla 3 muestra estos resultados.

25 **Tabla 3 - Rendimientos de proteína recombinante usando células huésped con el gen *menE* eliminado**

Proteína recombinante	Rendimiento usando huésped de <i>E. coli</i> natural	Rendimiento usando huésped de <i>E. coli</i> con el gen <i>menE</i> eliminado	% de cambio
PROT 1	1,9 g/l	2,5 g/l	30 %
PROT 2	5,5 g/l	6,5 g/l	20 %
AB1	0,7 g/l	1,0 g/l	40 %
AB2	0,46 g/l	0,72 g/l	50 %

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir una proteína recombinante, que incluye péptidos, polipéptidos y anticuerpos, que comprende
- (a) fermentar una célula de *E. coli* y en el que dicha célula de *E. coli* se ha transformado con un ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante, y
- 10 (b) recolectar dicha proteína recombinante en condiciones en las que el oxígeno disuelto (dO_2) se mantiene en niveles superiores a un 0 % de manera continua durante las operaciones de recolección de la etapa (b), en el que las operaciones de recolección comprenden una etapa de homogeneización, y en el que dicho dO_2 se mantiene
- 1) antes de la homogeneización en niveles superiores a un 75 %; y/o
- 15 2) después de la homogeneización a aproximadamente un 50 % o en niveles superiores a un 50 %; y
- (c) purificar dicha proteína recombinante para obtener un material filtrado para almacenamiento (FBS), en el que dicho material filtrado no contiene cantidades detectables de aducto de 1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA) y proteína recombinante, medido mediante un ensayo de cromatografía de intercambio iónico (IEC) a 310 nm.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ensayo analítico se realiza por HPLC, RP HPLC, HIC HPLC, RMN, espectrometría de masas o espectroscopia UV.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa c) comprende medir los niveles de aducto de DHNA y proteína recombinante en el material filtrado.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dO_2 se mantiene en niveles superiores a un 75 % antes de la homogeneización y durante un período igual o superior a 2 horas.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dO_2 se mantiene con rociado o burbujeo de aire, con un aumento de la contrapresión o con velocidad de agitación.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el aire rociado es de entre 0,4 vvm y 0,8 vvm.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el aire rociado es de 0,6 vvm.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la contrapresión incrementada es de entre 1,0 y 30 psi (6895 a 206 843 Pa).
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el aumento de la contrapresión es de 19 psi (131 000 Pa).
10. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la velocidad de agitación es de entre 6 vatios/l y 8 vatios/l.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la velocidad de agitación es de aproximadamente 6 vatios/l.



PW = agua purificada

C = Serie de control de desarrollo

1 = Serie 1

2 = Serie 2

3 = Serie 3

FIG. 1

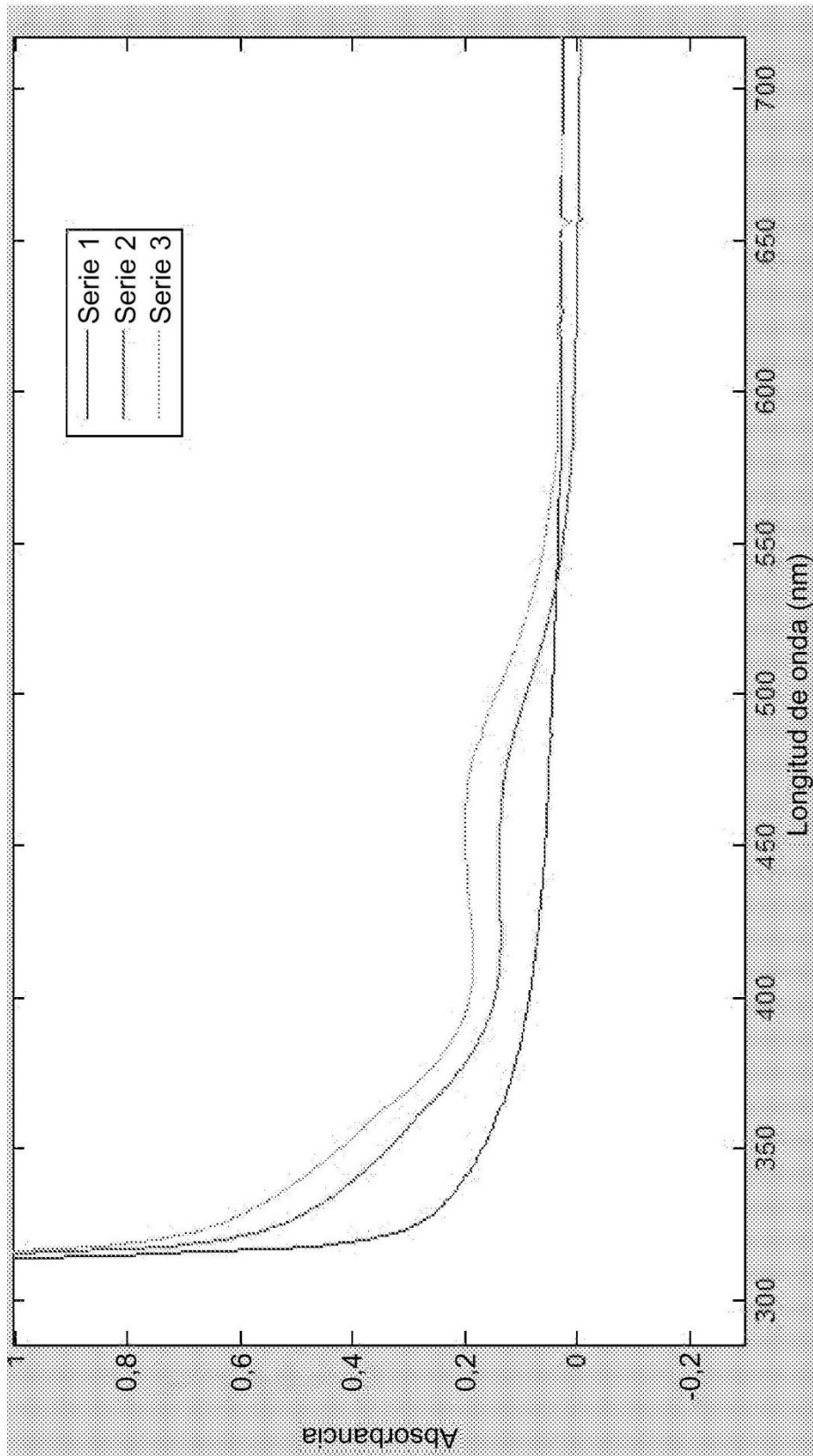


FIG. 2A

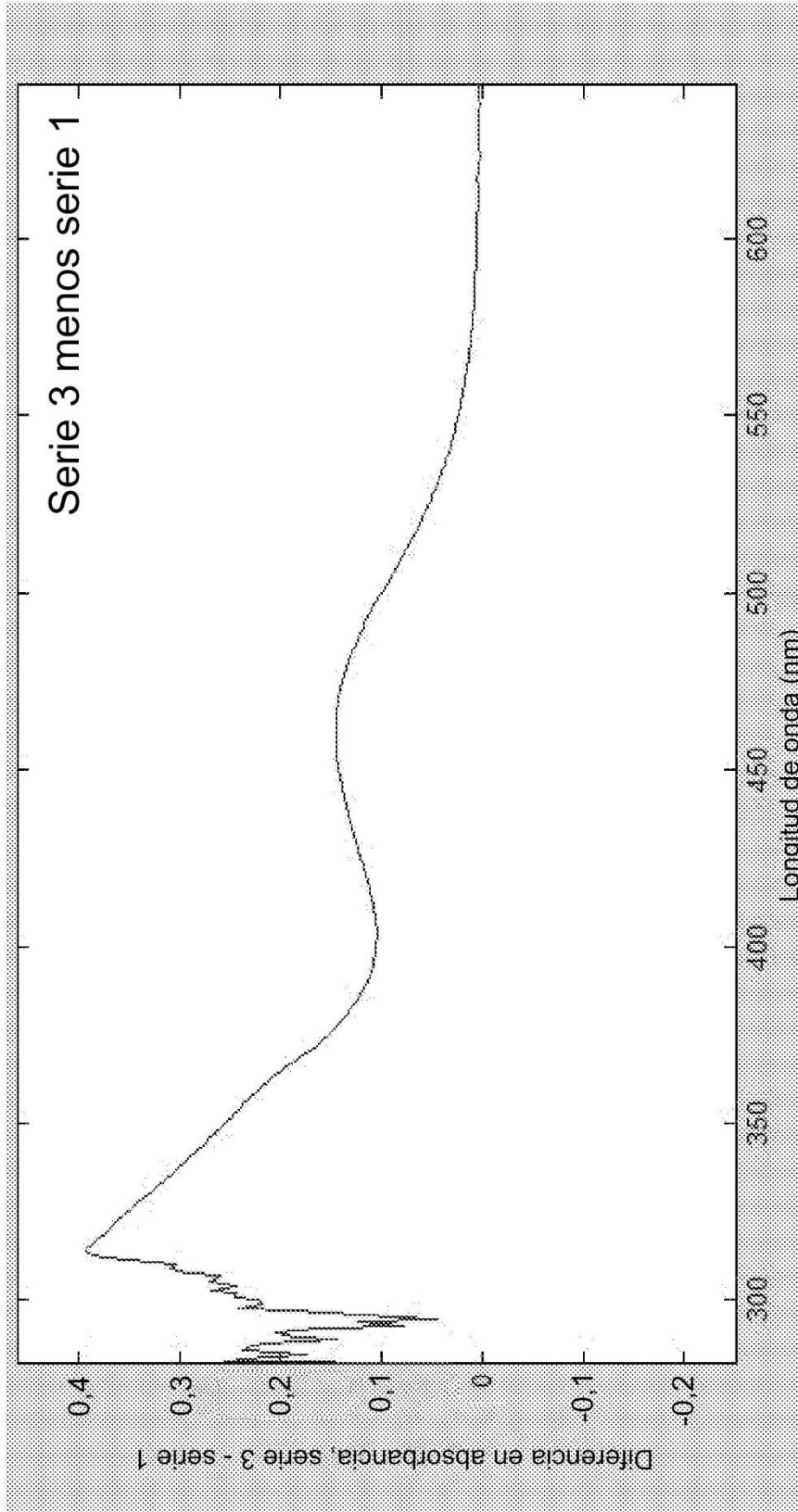


FIG. 2B

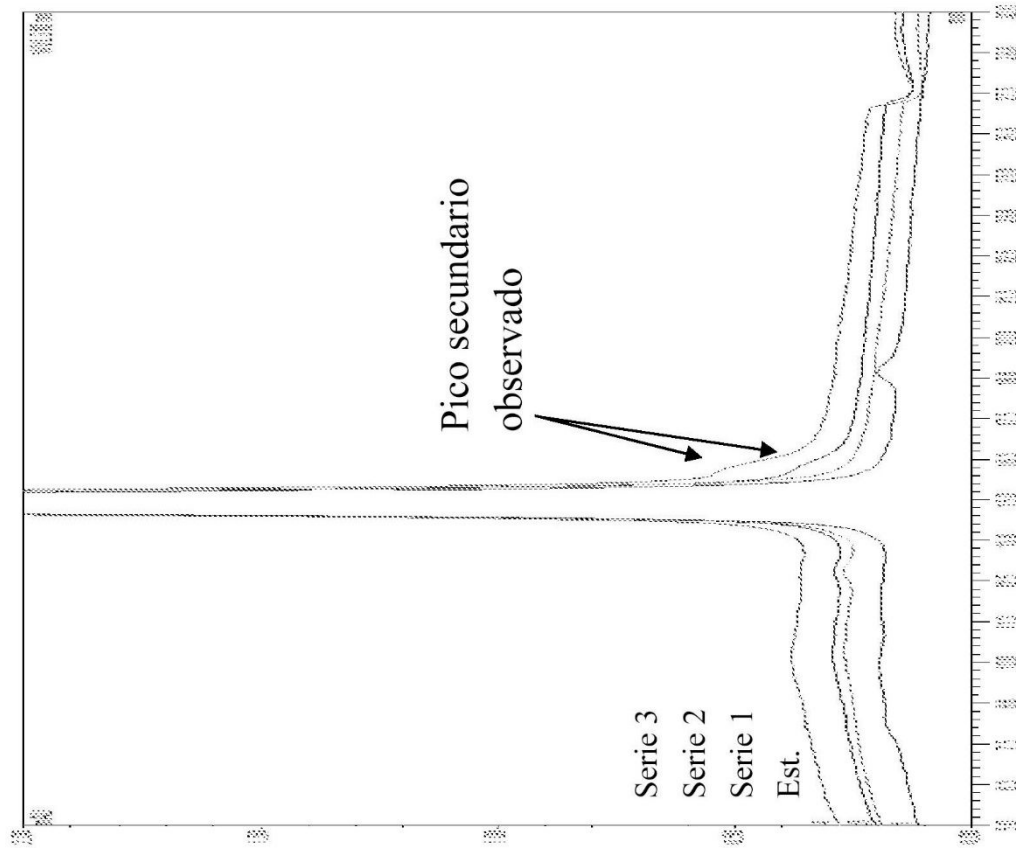


FIG. 3

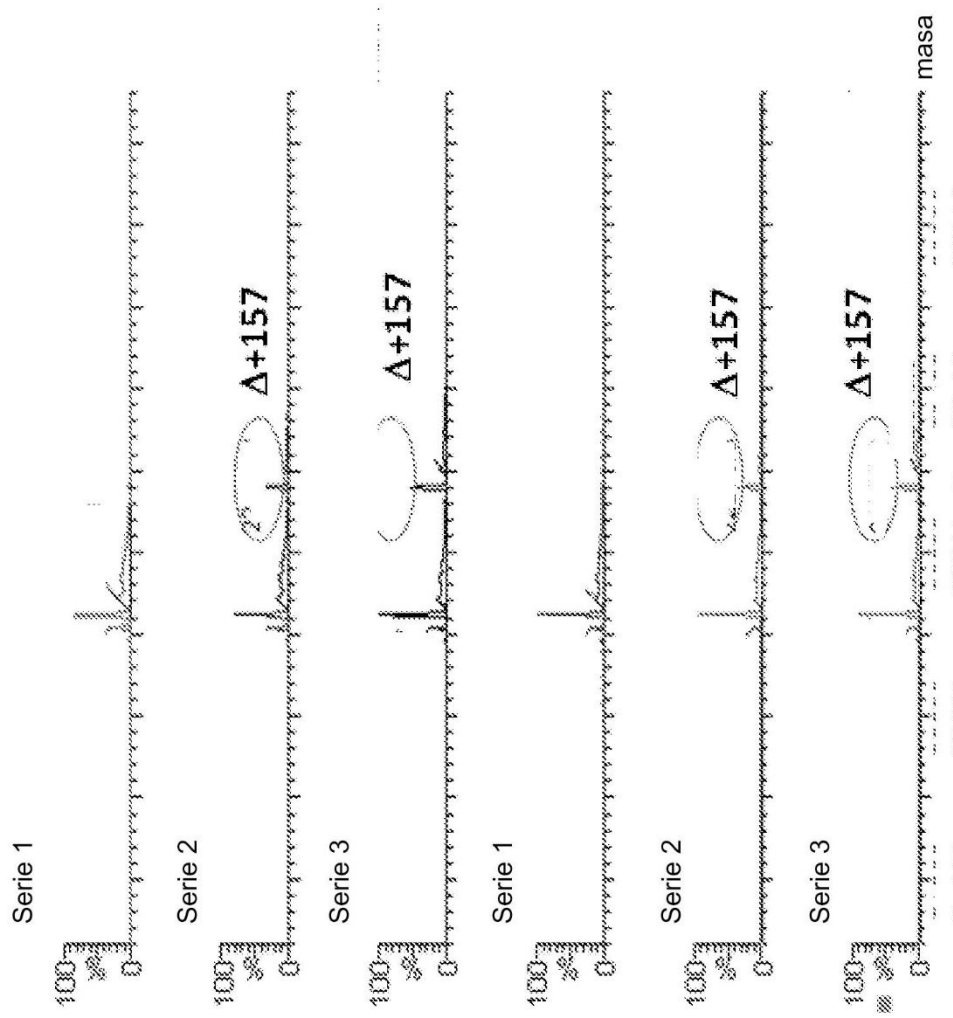


FIG. 4

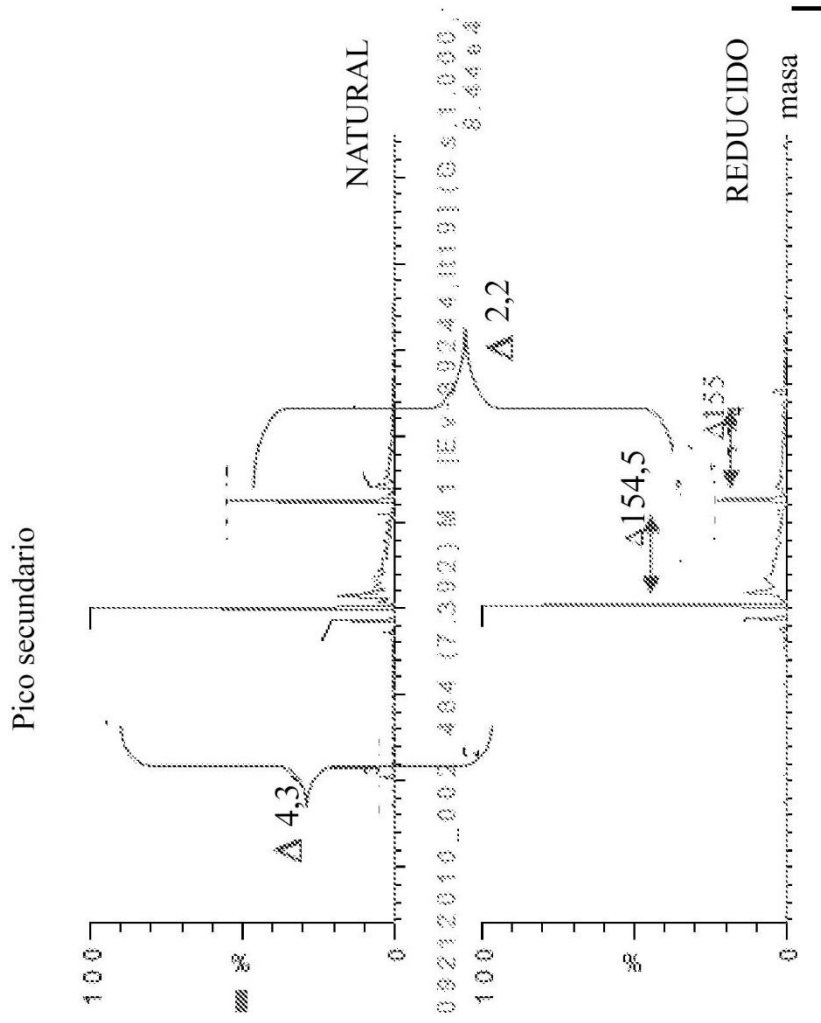


FIG. 5

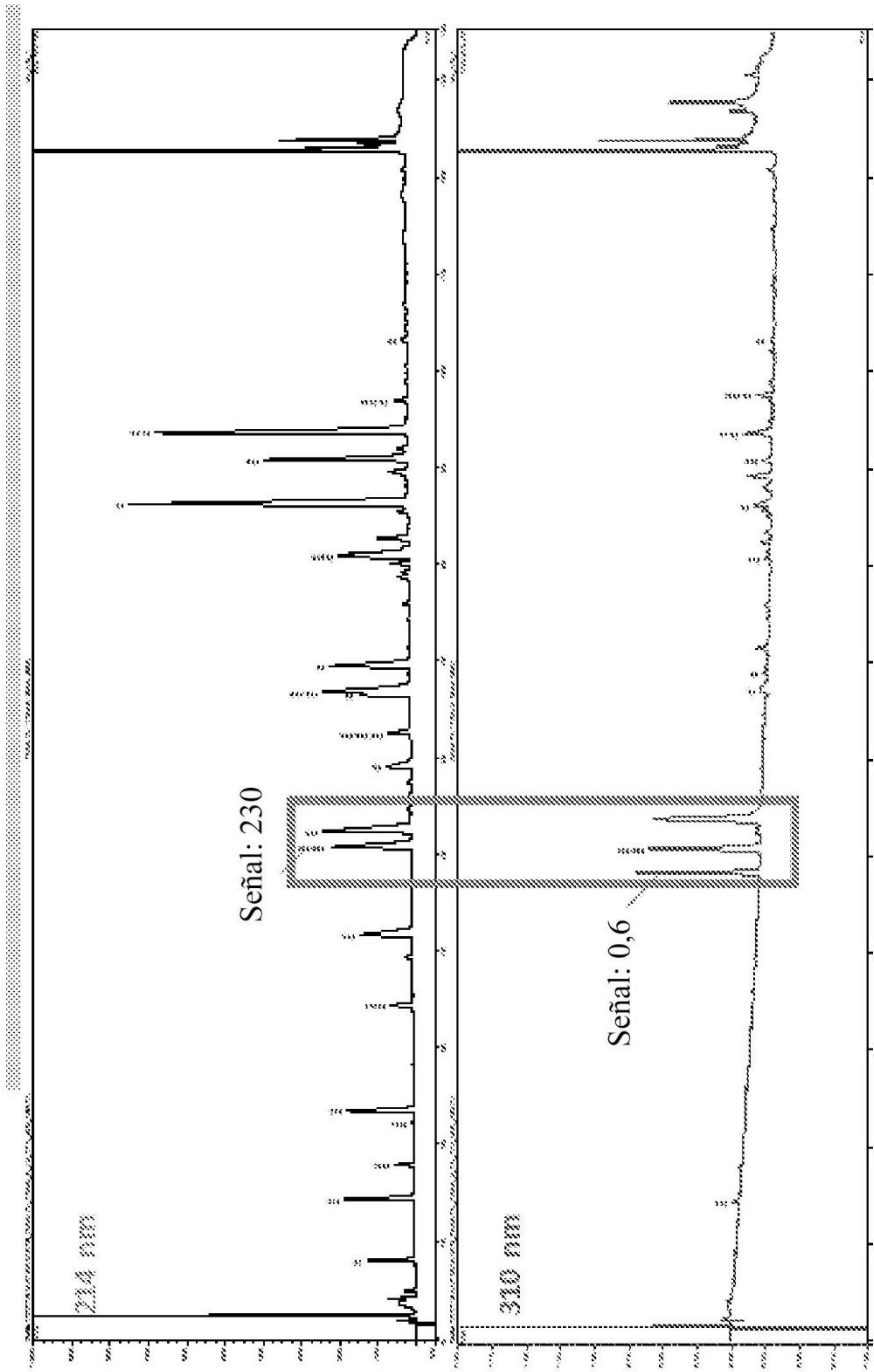


FIG. 6

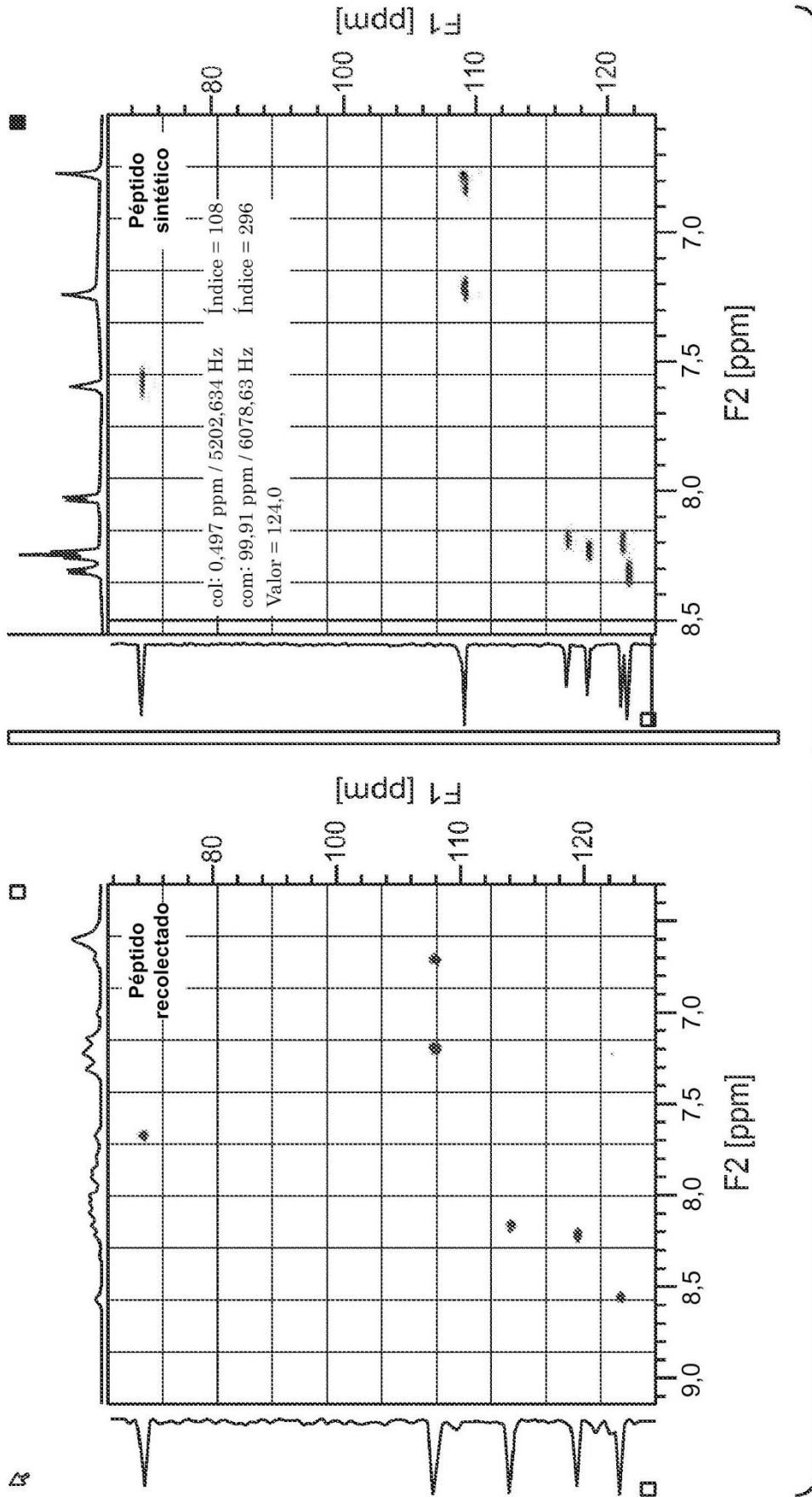


FIG. 7

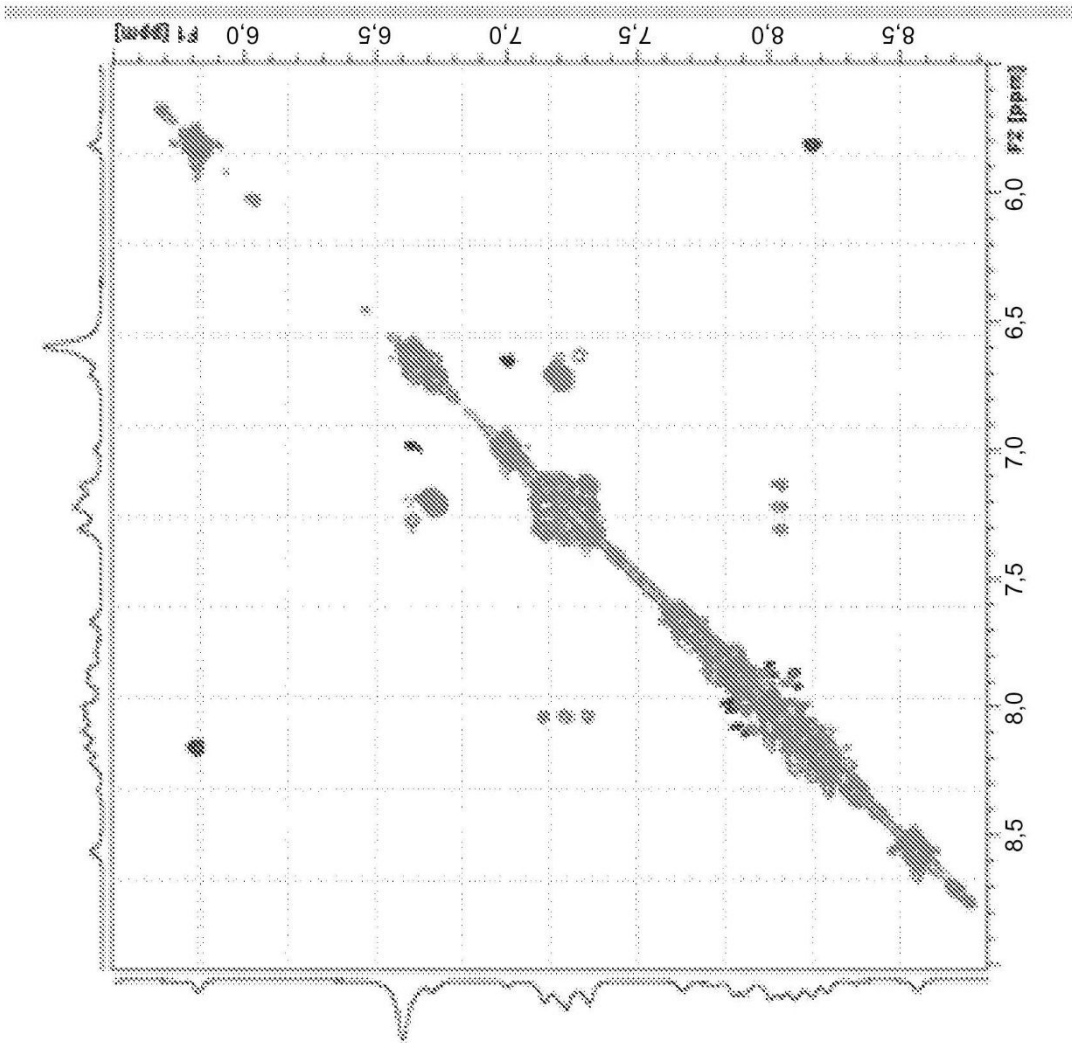


FIG. 8

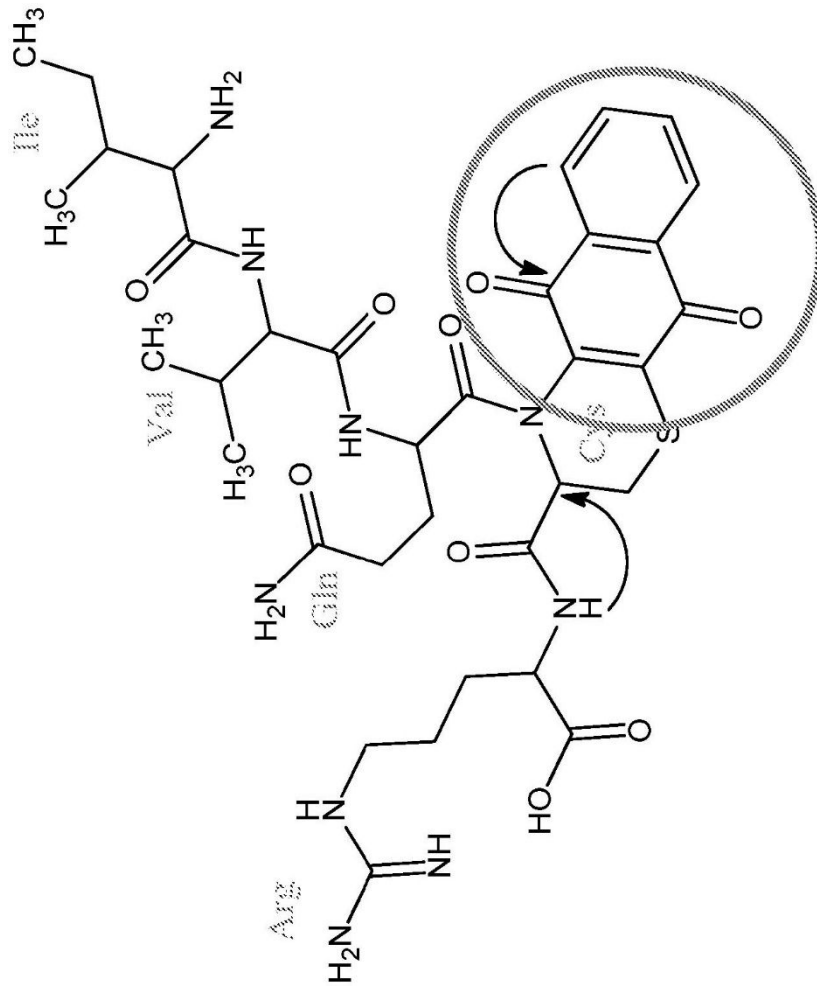


FIG. 9

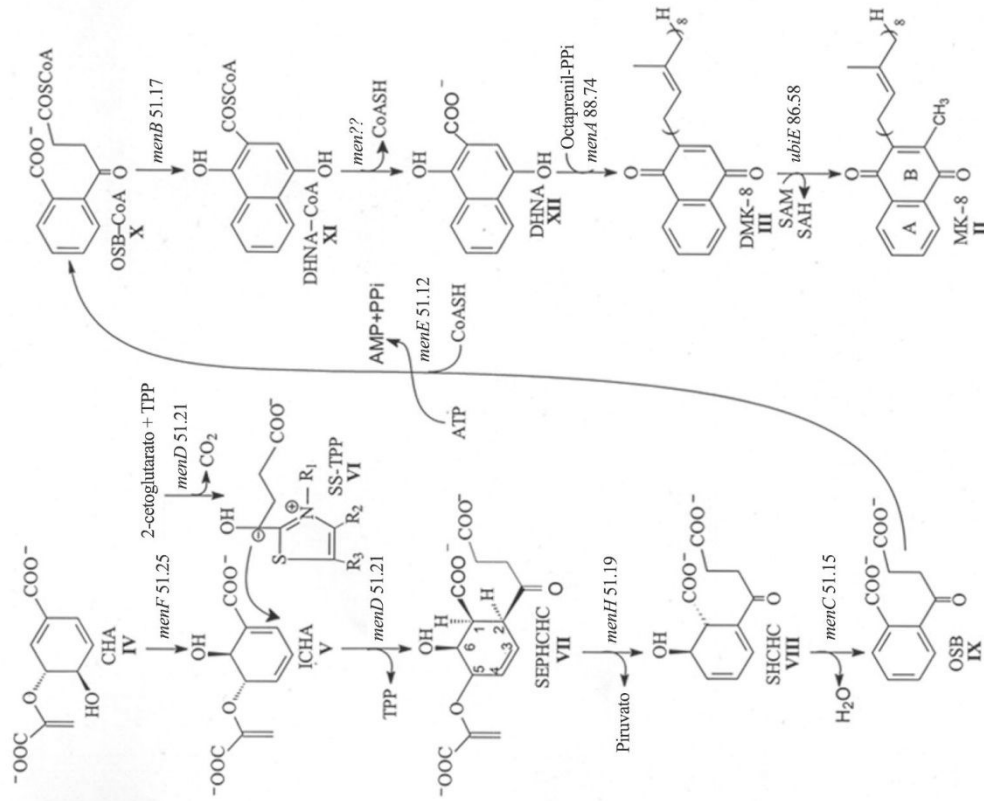


FIG. 10

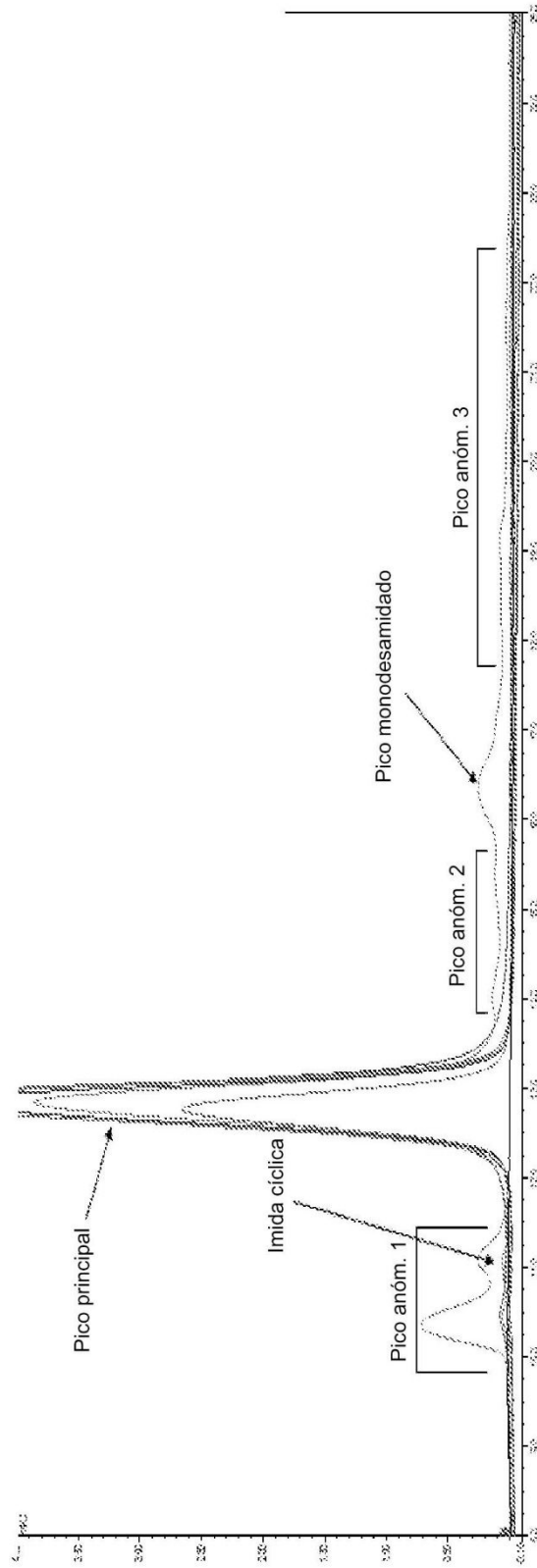


FIG. 11

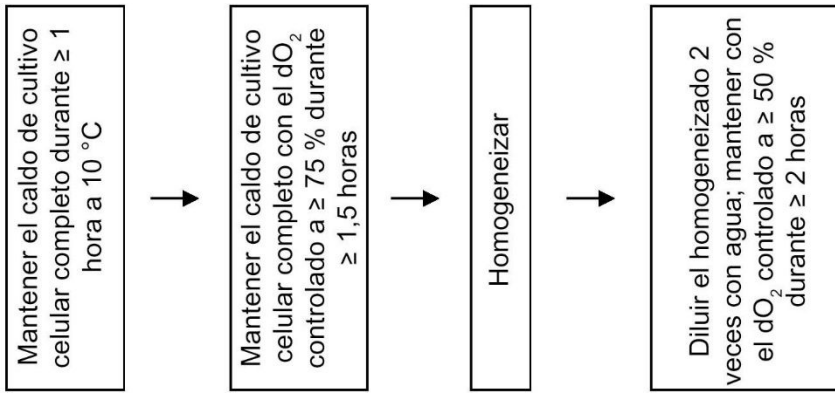


FIG. 12