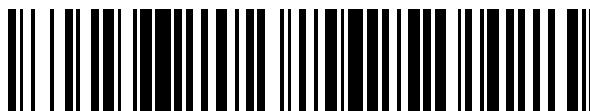


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 204**

51 Int. Cl.:

B01D 15/04	(2006.01)
B01J 41/20	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01)
B01J 41/14	(2006.01)
A61K 47/68	(2007.01)
B01D 15/16	(2006.01)
B01D 15/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/US2011/045524**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12015912**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11813105 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2613857**

54 Título: **Método para purificar inmunoconjugados**

30 Prioridad:

30.07.2010 US 369148 P

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

09.08.2018

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**LINKE, THOMAS;
WANG, WILLIAM, K.;
SHAH, AMBARISH;
SATHISH, HASIGE;
HUNTER, ALAN y
THOMPSON, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 678 204 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

Método para purificar inmunoconjugados

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención proporciona métodos para purificar un inmunoconjugado de una solución que contiene el inmunoconjugado y una variante ácida del mismo, en los que dicha variante ácida es una especie desamidada de dicho inmunoconjugado. También se desvelan formulaciones que contienen dichos polipéptidos o inmunoconjugados purificados.

15 Técnica antecedente

La purificación económica, a gran escala, de proteínas es un factor para la industria biofarmacéutica. Se producen típicamente proteínas terapéuticas usando líneas celulares procariotas o eucariotas que se modifican técnicamente para expresar la proteína de interés de un plásmido recombinante que contiene el gen que codifica la proteína. La separación de la proteína deseada de la mezcla de componentes suministrados a las células y productos secundarios celulares a una pureza adecuada, por ejemplo, suficiente para su uso como un producto terapéutico humano, plantea un reto formidable a los fabricantes de productos biológicos por varias razones.

20 Los fabricantes de productos farmacéuticos basados en proteínas deben cumplir pautas reguladoras estrictas, incluyendo requisitos de pureza extremadamente rigurosos. Para asegurar la seguridad, las agencias reguladoras, tales como la administración de fármacos y alimentos (FDA), requieren que los productos farmacéuticos basados en proteínas estén sustancialmente libres de impurezas, incluyendo tanto contaminantes relacionados con productos tales como agregados, fragmentos y variantes de la proteína recombinante y contaminantes relacionados con el proceso tales como proteínas de células hospedadoras, componentes de medios, virus, ADN y endotoxinas. Aunque diversos esquemas de purificación de proteínas están disponibles y se usan ampliamente en la industria biofarmacéutica, incluyen típicamente una etapa de purificación de afinidad, tales como purificación de proteína A en el caso de anticuerpos, para alcanzar un grado de pureza farmacéuticamente aceptable.

25 El desarrollo de un esquema de purificación aplicable a una biomolécula particular o diversas biomoléculas que pueda cambiarse de escala, que sea controlable y que emplee estratégicamente el uso de resinas particulares o una combinación de resinas permitirá su integración en desarrollo de productos en un estadio muy temprano en el desarrollo de fármacos general. Este enfoque para el diseño de un esquema de purificación puede minimizar cambios costosos para procesos de fabricación que pueden de otro modo ser necesarios más tarde en el desarrollo de fármacos o, aún peor, después de la aprobación. A medida que el proceso se aumenta de escala y se acerca a las condiciones de producción de GMP, surgen complejidades inherentes adicionales, incluyendo las asociadas con empaquetamiento de resina y preparación de tampón. El proceso de fabricación, y su capacidad, puede mejorarse simplificando el esquema de purificación, eliminando etapas del proceso y maximizando el rendimiento y la productividad, manteniendo al mismo tiempo la integridad y pureza de la molécula que se purifica. Por lo tanto, sería deseable y ventajoso comenzar con un proceso sencillo y eficaz que pueda producir una sustancia farmacológica de alta calidad y seguridad.

30 Una complejidad asociada con la purificación de un producto farmacológico es el mantenimiento de la potencia a lo largo del proceso de purificación. Muchos factores pueden contribuir a una reducción o inhibición de la potencia, incluyendo la modificación del producto farmacológico durante el proceso de desarrollo. Dicha modificación puede producirse en diversos estadios del proceso, por ejemplo, cuando la proteína se expresa en la célula, o cuando una proteína que se ha aislado de una célula se somete a diversas condiciones o tampones. La presente invención proporciona un método para purificar un inmunoconjugado activo de una solución que contiene una variante modificada del inmunoconjugado, donde la presencia de esta variante modificada da como resultado una inhibición de la potencia del producto farmacológico final.

35 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para purificar un polipéptido de interés de una solución que contiene el polipéptido y una variante ácida, tal como una variante desamidada, del polipéptido.

40 En particular, la presente invención proporciona un método para purificar un inmunoconjugado activo, donde el inmunoconjugado está desamidado en uno o más restos y en el que la desamidación da como resultado una inhibición de la potencia de dicho inmunoconjugado, comprendiendo el método: (a) poner en contacto el inmunoconjugado con una matriz de cromatografía de intercambio aniónico ALEX; y (b) eluir el inmunoconjugado unido de la matriz de cromatografía ALEX con un tampón de alta salinidad, como se define en las reivindicaciones, separando de este modo el inmunoconjugado activo de la variante desamidada.

La invención también proporciona un método, como se define en las reivindicaciones, para producir un polipéptido purificado de una solución que comprende el polipéptido y una variante ácida del polipéptido, donde la variante ácida del polipéptido da como resultado una inhibición de la potencia del polipéptido, comprendiendo el método: (a) poner en contacto el polipéptido con una matriz de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX); y (b) eluir el polipéptido unido de la matriz de cromatografía AIEX con un tampón de alta salinidad, separando de este modo dicho polipéptido de la variante ácida y produciendo un polipéptido purificado.

En particular, la invención proporciona un método para producir un polipéptido purificado de una solución que comprende el polipéptido y una variante ácida del polipéptido, en el que dicha variante ácida del polipéptido da como resultado una inhibición de la potencia de dicho polipéptido, comprendiendo el método: (a) poner en contacto el polipéptido con una matriz de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX); y (b) eluir el polipéptido unido de la matriz de cromatografía AIEX con un gradiente salino lineal que sea de aproximadamente NaCl 150 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 300 mM en Tris/HCl, pH 8,0, de aproximadamente NaCl 175 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 275 mM en Tris/HCl, pH 8,0 o de aproximadamente NaCl 192 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 245 mM en Tris/HCl, pH 8,0, separando de este modo dicho polipéptido de la variante ácida y produciendo un polipéptido purificado; en el que el polipéptido es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con el receptor de superficie celular CD22 y que comprende una exotoxina de *Pseudomonas*, o variante de la misma.

Se desvela con la presente un método para producir un polipéptido o inmunocombinado purificado de una solución que comprende el polipéptido y una variante ácida del polipéptido, comprendiendo el método: (a) producir el polipéptido o inmunocombinado en una célula bacteriana que expresa el polipéptido o inmunocombinado; (b) aislar cuerpos de inclusión que contienen el polipéptido o inmunocombinado de las células bacterianas; (c) replegar el polipéptido o inmunocombinado aislado de los cuerpos de inclusión; (d) poner en contacto la composición que contiene el polipéptido o inmunocombinado con una matriz de cromatografía AIEX; y (e) eluir el polipéptido o inmunocombinado unido de la matriz de cromatografía AIEX con un tampón de alta salinidad, purificando de este modo el polipéptido o inmunocombinado de la solución.

En determinadas realizaciones, la variante ácida es una variante desamidada. En realizaciones adicionales, se retira entre aproximadamente el 75 y aproximadamente el 99 % de la variante ácida o desamidada durante el proceso de purificación, en particular aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

La matriz AIEX empleada en los métodos de la invención contiene grupos de intercambio iónico de amina cuaternaria o amina terciaria, un grupo amino cuaternario (Q). En determinadas realizaciones, la matriz AIEX es Q sepharose.

El polipéptido o inmunocombinado puede eluirse con un gradiente salino lineal o por etapas. En determinadas realizaciones, el gradiente salino lineal es de aproximadamente NaCl 150 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 300 mM en Tris/HCl, pH 8,0, de aproximadamente NaCl 175mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 275 mM en Tris/HCl, pH 8,0 o de aproximadamente NaCl 192 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 245 mM en Tris/HCl, pH 8,0.

En una realización, el polipéptido o inmunocombinado al que se aplican los métodos de la invención comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv monocatenario o scFv, un Fv con enlaces disulfuro, un dominio NAR V, un IgNar, un intracuerpo, un IgG-ΔCH₂, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, DVD-Ig, Fcab, mA₂, un (scFv)₂ o un scFv-Fc. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un receptor de superficie celular, tal como el receptor de superficie celular CD22. En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de VH y VL, donde la célula de VH se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6-11 y la secuencia de VL se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 12-15.

En otra realización, el polipéptido o inmunocombinado comprende una toxina, donde la toxina se selecciona entre el grupo que consiste en: exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de la misma, así como toxinas botulínicas A a F o variantes, o derivados de las mismas. En determinadas realizaciones, la exotoxina de *Pseudomonas*, o variante de la misma tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 16-22. En una realización particular, el inmunocombinado es la inmunotoxina CAT-8015 que comprende la subunidad VH-PE38 de SEQ ID NO: 1 y la subunidad VL de SEQ ID NO: 2.

También se desvela con la presente una composición que comprende un inmunocombinado purificado que tiene menos de entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 1 % de especies desamidadas, en la que dicho inmunocombinado se purifica por cualquiera de los métodos descritos anteriormente. La composición puede tener menos de aproximadamente 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de la especie desamidada presente. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o inmunocombinado purificado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe con la presente una formulación que comprende CAT-8015 1 mg/ml en fosfato de sodio 25 mM, sacarosa 4 %, glicina 8 %, polisorbato 80 (PS80) 0,02 %, pH 7,4. La formulación puede estar liofilizada.

La invención también proporciona un método para modificar la bioactividad de una solución polipeptídica que comprende un polipéptido y una variante desamidada, en el que el polipéptido es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con el receptor de superficie celular CD22 y que comprende una exotoxina de *Pseudomonas* o variante de la misma, comprendiendo el método separar el polipéptido de la variante desamidada por cromatografía ALEX de elución lineal; y combinar el polipéptido purificado y la variante desamidada en cantidades fijas para obtener la bioactividad deseada de la solución polipeptídica.

Breves descripciones de los dibujos

Figura 1. Un gráfico que representa un perfil de cromatografía de intercambio iónico (IEC) de un patrón de referencia CAT-8015. El pico previo de CAT-8015 representa la mayoría de CAT-8015 desamidado o isodesamidado, mientras que el pico principal contiene la mayoría del inmunocombinado CAT-8015 intacto, activo.

Figura 2. Un gráfico que representa la correlación entre el porcentaje de potencia relativa de CAT-8015 y el porcentaje de pico previo en la muestra.

Figura 3. Un gráfico que representa un perfil de elución de purificación a escala de laboratorio de CAT-8015 por cromatografía de Q Sepharose HP. CAT-8015 se purificó usando Q sepharose HP. La mayor parte del CAT-8015 intacto, activo, residió en las fracciones D5, D7 y D9 (el pico principal que abarca de D3 a D12 como se indica sobre el pico).

Figura 4. Un análisis por SDS-PAGE de muestras de grupos de carga y eluato de QHP (purificación a escala de laboratorio). El carril 1 corresponde al grupo de carga de QHP; el carril 2 corresponde al grupo de eluato de QHP; y el carril 3 corresponde a un patrón de referencia de CAT-8015.

Figura 5. Purificación a gran escala de CAT-8015 mediante cromatografía de Q Sepharose HP. CAT-8015 se purificó usando Q sepharose HP. Como se muestra en la figura y en la Tabla 3, la mayor parte del CAT-8015 intacto, activo, residió en las fracciones 5, 6, 7.

Figura 6. Un análisis por SDS-PAGE de muestras de grupos de carga y eluato de QHP (purificación a gran escala). El carril 1 corresponde al grupo de carga de QHP; y el carril 2 corresponde al grupo de eluato de QHP.

Figura 7. Un gráfico que representa el porcentaje del pico previo en el producto HA en función del pH de solubilización como se describe en el Ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos para purificar un inmunocombinado como se define en las reivindicaciones de una solución que contiene el polipéptido o inmunocombinado y una variante ácida del mismo. En una realización, la variante ácida comprende una forma desamidada del polipéptido o inmunocombinado. A diferencia del comportamiento de elución esperado de una columna de intercambio aniónico, la mayor parte de las variantes desamidadas eluyen antes que los polipéptidos intactos en condiciones de elución en gradiente salino. Se proporcionan en el presente documento detalles de los métodos.

Los términos "polipéptido", "péptido", "proteína", y "fragmento de proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Son aminoácidos de origen natural los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico (o aspartato) y ácido glutámico (o glutamato). Los aminoácidos con carga positiva incluyen arginina, histidina y lisina.

La "composición" para purificar en el presente documento comprende el polipéptido de interés y una o más impurezas. La composición puede estar "parcialmente purificada" (es decir, que se ha sometido a una o más etapas de purificación, tales como cromatografía no de afinidad descrita en el presente documento) o puede obtenerse

directamente de una célula hospedadora u organismo que produce el polipéptido (por ejemplo, la composición puede comprender líquido de cultivo celular recogido).

5 Las expresiones "polipéptido" o "polipéptido de interés" o "proteína de interés" y "proteína diana" o "proteína" se usan indistintamente y se refieren a una proteínas o un polipéptido tal como un anticuerpo o inmunoconjugado (como se define en el presente documento) que debe purificarse por un método de la invención a partir de una mezcla de proteínas y otros materiales tales como una variante ácida del polipéptido de interés.

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

15 Son proteínas desamidadas las que han tenido algunos o todos los grupos funcionales amida libres hidrolizados a ácidos carboxílicos, tal como conversión glutaminas a ácido glutámico. La velocidad de esta reacción depende de la secuencia primaria, estructura tridimensional, pH, temperatura, tipo de tampón, fuerza iónica y otras propiedades de solución. Es importante destacar que la reacción de desamidación introduce una carga negativa en la molécula. Como se describe adicionalmente a continuación, la desamidación de proteínas puede tener una influencia negativa en la actividad proteica.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describen en el presente documento. Se pretende que la expresión "anticuerpo biespecífico" incluya cualquier
25 anticuerpo que tenga dos especificidades de unión diferentes, es decir, el anticuerpo se une con dos epítomos diferentes, que pueden localizarse en el mismo antígeno diana o, más habitualmente, en diferentes antígenos diana.

Los anticuerpos nativos e inmunoglobulinas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de
30 aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (dominio V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio
35 constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Clothia *et al.*, J. Mol. Biol. 186, 651-66, 1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4592-4596 (1985)). Se definen cinco clases de inmunoglobulina humana basándose en su composición de cadena pesada y se denominan IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Los anticuerpos de clase IgG e IgA se dividen además en subclases, concretamente, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2. Las cadenas pesadas en anticuerpos IgG, IgA e IgD tienen tres dominios de región
40 constante, que se designan CH1, CH2 y CH3, y las cadenas pesadas en anticuerpos IgM e IgE tienen cuatro dominios de región constante, CH1, CH2, CH3 y CH4. Por lo tanto, las cadenas pesadas tienen una región variable y tres o cuatro regiones constantes. La estructura y función de inmunoglobulinas se revisan, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y fragmentos Fv monocatenarios, anticuerpos lineales, anticuerpos
50 monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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 salvo por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar
55 presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se unen con un único antígeno. Asimismo, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Que un anticuerpo "se una de manera selectiva" o "se una de manera específica" significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de lo anterior con un epítipo que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. "Se une de manera selectiva" o "se une de manera específica" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une con una proteína con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, pero más habitualmente al menos aproximadamente 1 μ M. "Se une de manera selectiva" o "se une de manera específica" significa en ocasiones que un anticuerpo se une con una proteína en ocasiones con una K_D de al menos
60 0,1 μ M o mejor, y en otras ocasiones 0,01 μ M o mejor. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas

homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de células tumorales en más de una especie.

Los anticuerpos del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos.

El término "inmunoconjugado" o "conjugado" o "inmunotoxina" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión celular (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 o fragmento del mismo) y se define por una fórmula genérica: C-L-A, en la que C = citotoxina, L = enlazador y A = agente de unión celular (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD22). Los inmunoconjugados también pueden definirse por la fórmula genérica en orden inverso: A-L-C.

La expresión "citotoxina" o "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina diftérica (DT), toxina botulínica o toxinas modificadas de las mismas. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente provocan la muerte mediante toxicidad hepática. PE y DT, sin embargo, pueden modificarse a una forma para su uso como una inmunotoxina retirando el componente de dirección nativo de la toxina (por ejemplo, dominio Ia de PE o la cadena B de DT) y reemplazándolo con un resto de dirección diferente, tal como un anticuerpo.

En algunas realizaciones, la toxina es exotoxina de *Pseudomonas*. La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular de 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas mediante la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) catalizando su ADP-ribosilación (catalizando la transferencia del resto de ADP ribosilo de NAD oxidado en EF-2).

La toxina contiene tres dominios estructurales que actúan en concierto para provocar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media en la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la traslocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media en la ADP ribosilación del factor de elongación 2, que inactiva la proteína y provoca la muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue sin estar

definida, aunque una gran parte de él, los aminoácidos 365-380, puede suprimirse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 14256-14261 (1989).

Las exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) empleadas en la presente invención incluyen la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes modificadas de forma conservativa de la PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen los que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico u otro posterior en la célula diana (por ejemplo, como una proteína o preproteína). Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35. PE40 es un derivado truncado de PE como se ha descrito previamente en la técnica. Véase, Pai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3358-62 (1991); Kondo *et al.*, J. Biol. Chem. 263:9470-9475 (1988). PE38 es una PE truncada compuesta de los aminoácidos 253-364 y 381-613 de PE nativa. PE35 es un fragmento carboxilo terminal de 35 kD de PE compuesto de una Met en la posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de PE nativa. En una realización, se emplea el fragmento citotóxico PE38. PE38 es una proproteína que puede activarse en su forma citotóxica tras su procesamiento dentro de una célula.

Un "inmunoconjugado de PE" o una "inmunotoxina de PE" es un inmunoconjugado o una inmunotoxina que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una toxina PE o variante de la misma.

Por "purificar" un polipéptido o inmunoconjugado de una composición que comprende el polipéptido y una o más impurezas se entiende aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición retirando (completa o parcialmente) al menos una impureza de la composición. Según la presente invención, se realiza purificación sin el uso de una etapa de cromatografía de afinidad.

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

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

La expresión "material de intercambio iónico" se refiere a una fase sólida que tiene carga negativa (es decir, una resina de intercambio catiónico) o carga positiva (es decir, una resina de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse uniendo uno o más ligandos con carga a la fase sólida, por ejemplo, mediante enlace covalente. Como alternativa, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, como sucede para el sílice, que tiene una carga general negativa).

Una "resina de intercambio aniónico" se refiere a una fase sólida que tiene carga positiva, que tiene por lo tanto uno o más ligandos con carga positiva unidos a la misma. Puede usarse cualquier ligando con carga positiva unido a la fase sólida adecuado para formar la resina de intercambio aniónico, tal como grupos amino cuaternarios. Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen DEAE celulosa, Poros PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 de Applied Biosystems, Sartobind Q de Sartorius, MonoQ, MiniQ, Source 15Q y 30Q, Q, DEAE y ANX Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare), WP PEI, WP DEAM, WP QUAT de J. T. Baker, Hydrocell DEAE y Hydrocell QA de Biochrom Labs Inc., UNOsphere Q, Macro-Prep DEAE y Macro-Prep High Q de Biorad, Ceramic HyperD Q, ceramic HyperD DEAE, Trisacryl M y LS DEAE, Spheredex LS DEAE, QMA Spherosil LS, QMA Spherosil M y Mustang Q de Pall Technologies, resinas aniónicas de base fuerte de malla fina de tipo I y de tipo II DOWEX y DOWEX MONOSPHERE 77, anión de base débil de Dow Liquid Separations, membrana Intercept Q, Matrex Cellufine A200, A500, Q500 y Q800, de Millipore, Fractogel EMD TMAE, Fractogel EMD DEAE y Fractogel EMD DMAE de EMD, intercambiadores aniónicos débiles fuertes de tipo I y II Amberlite, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes de tipo I y II DOWEX, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes de tipo I y II Diaion, Duolite de Sigma-Aldrich, TSK gel Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl SuperQ-650S, 650M y 650C, QAE-550C y 650S, DEAE-650M y 650C de Tosoh, QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D y Express-Ion Q de Whatman.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que pueden adherirse uno o más ligandos con carga. La fase sólida puede ser una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas, una membrana o un filtro, etc. Los ejemplos de materiales para formar la fase sólida incluyen polisacáridos (tales como agarosa y celulosa); y otras matrices mecánicamente estables tales como sílice (por ejemplo, vidrio de poro controlado), poli(estirendivinil)benceno, poliacrilamida, partículas de cerámica y derivados de cualquiera de los anteriores.

La expresión "unión específica", como se usa en el presente documento, tal como para describir interacciones entre una molécula de interés y un ligando unido a una matriz de fase sólida, se refiere a la unión en general reversible de una proteína de interés con un ligando mediante los efectos combinados de complementariedad espacial de estructuras de proteína y ligando en un sitio de unión acoplado con fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y/o fuerzas de Van der Waals en el sitio de unión. Cuanto mayor sea la complementariedad espacial y más fuertes sean las otras fuerzas en el sitio de unión, mayor será la especificidad de unión de una proteína por su ligando respectivo. Los ejemplos no limitantes de unión específica incluyen unión de anticuerpo-antígeno, unión de enzima-sustrato, unión de enzima-cofactor, quelación de ion metálico, unión de proteína de unión a ADN-ADN, interacciones de proteína reguladora-proteína, y similares.

La expresión "unión no específica", como se usa en el presente documento, tal como para describir interacciones entre una molécula de interés y un ligando u otro compuesto unido a una matriz de fase sólida, se refiere a la unión de una proteína de interés con el ligando o compuesto en una matriz de fase sólida mediante fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y/o fuerzas de Van der Waals en un sitio de interacción, pero que carece de complementariedad estructural que potencie los efectos de las fuerzas no estructurales. Los ejemplos de interacciones no específicas incluyen, pero sin limitación, fuerzas electrostáticas, hidrófobas y de van der Waals así como enlaces de hidrógeno.

Una "sal" es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Una sal útil en para la invención incluye, pero sin limitación, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), citrato (por ejemplo, citrato de sodio), cloruro (por ejemplo, cloruro de sodio), sulfato (por ejemplo, sulfato de sodio) o una sal de potasio.

El término "detergente" se refiere a tensioactivos iónicos y no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecil sulfato de sodio (SDS); lauril sulfato de sodio; octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-aurato de sodio o metil oleoil-aurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), Un detergente útil es un polisorbato, tal como polisorbato 20 (TWEEN 20®) o polisorbato 80 (TWEEN 80®).

Un "tampón" usado en la presente invención es una solución que resiste cambios de pH por la adición de ácido o base mediante la acción de sus componentes de conjugados de ácido-base. Pueden emplearse diversos tampones en un método de la presente invención dependiendo del pH deseado del tampón y la etapa particular en el proceso de purificación [véase Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)]. Los ejemplos no limitantes de componentes de tampón que pueden usarse para controlar el intervalo de pH deseable para un método de la invención incluyen acetato, citrato, histidina, fosfato, tampones de amonio tales como acetato de amonio, succinato, MES, CHAPS, MOPS, MOPSO, HEPES, Tris, y similares, así como combinaciones de estos TRIS-ácido málico-NaOH, maleato, cloroacetato, formiato, benzoato, propionato, piridina, piperazina, ADA, PIPES, ACES, BES, TES, tricina, bicina, TAPS, etanolamina, CHES, CAPS, metilamina, piperidina, ácido O-bórico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido butanodioico, ácido dietilmalónico, glicilglicina, HEPPS, HEPPSO, imidazol, fenol, POPSO, succinato, TAPS, basado en amina, bencilamina, trimetil o dimetil o etil o fenil amina, etilendiamina o morfina. Pueden estar presentes componentes adicionales (aditivos) en un tampón según sea necesario, por ejemplo, pueden usarse sales para ajustar la fuerza iónica del tampón, tales como cloruro de sodio, sulfato de sodio y cloruro de potasio; y otros aditivos tales como aminoácidos (tales como glicina e histidina), caótopos (tales como urea), alcoholes (tales como etanol, manitol, glicerol y alcohol bencilico), detergentes (véase anteriormente) y azúcares (tales como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa y fructosa). Los componentes de tampón y aditivos, y las concentraciones usadas, pueden variar según el tipo de cromatografía practicada en la invención.

El "tampón de carga" es el que se usa para cargar la composición que comprende la molécula polipeptídica de interés y una o más impurezas en la resina de intercambio iónico. El tampón de carga tiene una conductividad y/o un pH tal que la molécula polipeptídica de interés (y en general una o más impurezas) está/n unida/s a la resina de intercambio iónico o de modo que la proteína de interés fluya a través de la columna mientras que las impurezas se unen con la resina.

La expresión "tampón de lavado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un tampón usado para lavar o reequilibrar la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula polipeptídica de interés. De manera práctica, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser el mismo, pero esto no es necesario.

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

El "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refiere al pH al que la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa, el pI puede calcularse a partir de la carga neta de los restos de aminoácidos o restos de ácido siálico de carbohidratos unidos del polipéptido o puede determinarse por isoelectroenfoque.

Por "unión" de una molécula con un material de intercambio iónico se entiende exponer la molécula al material de intercambio iónico en las condiciones apropiadas (pH/conductividad) de modo que la molécula se inmovilice de forma reversible en o sobre el material de intercambio iónico en virtud de interacciones iónicas entre la molécula y un grupo con carga o grupos con carga del material de intercambio iónico.

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

Se entiende que "eluir" una molécula (por ejemplo, polipéptido o impureza) de un material de intercambio iónico retira la molécula del mismo alterando la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio iónico de modo que el tampón compite con la molécula por los sitios con carga en el material de intercambio iónico.

Como se usa en la presente divulgación y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", y "el" o "la" incluyen formas plurales salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

Se entiende que siempre que se describan realizaciones en el presente documento con la expresión "que comprende", también se proporcionan realizaciones por lo demás análogas descritas con expresiones de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Se pretende que la expresión "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento incluya "A y B", "A o B", "A", y "B". De forma similar, se pretende que la expresión "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" abarque cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Exotoxina de *Pseudomonas* y otras toxinas

Las toxinas pueden emplearse con anticuerpos de la presente invención para producir inmunotoxinas. Las toxinas ejemplares incluyen ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de la misma, así como toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas están disponibles fácilmente en fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.). La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (ricino). La expresión también hace referencia a variantes tóxicas de la misma. Por ejemplo, véase, Patentes de los Estados Unidos n.º 5.079.163 y 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) aparece en dos formas designadas RCA₆₀ y RCA₁₂₀ según sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kD, respectivamente (Nicholson y Blaustein, J. Biochem. Biophys. Acta 266:543 (1972)). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y destruir células. La cadena B une ricina con restos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A al citosol (Olsnes, *et al.*, Nature 249:627-631 (1974) y Patente de los Estados Unidos n.º 3.060.165).

La abrina incluye lectinas tóxicas de *Abrus precatorius*. Los principios tóxicos, abrina a, b, c y d, tienen un peso molecular de aproximadamente 63 a 67 kD y están compuestos de dos cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro A y B. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas; la cadena B (abrina b) se une con restos de D-galactosa (véase, Funatsu, *et al.*, Agr. Biol. Chem. 52:1095 (1988); y Olsnes, Methods Enzymol. 50:330-335 (1978)).

En realizaciones preferidas de la presente invención, la toxina es exotoxina de *Pseudomonas* (PE). La exotoxina de *Pseudomonas* (o exotoxina A) es una exotoxina producida por *Pseudomonas aeruginosa*. La expresión "exotoxina de *Pseudomonas*" como se usa en el presente documento se refiere a una PE nativa (de origen natural) de longitud completa o una PE que se ha modificado. Tales modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, eliminación del dominio Ia, diversas supresiones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos individuales y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo terminal tales como KDEL (SEQ ID NO: 3) y REDL (SEQ ID NO: 4). Véase Siegall, *et al.*, J. Biol. Chem. 264:14256-14261 (1989). En una realización preferida, el fragmento citotóxico de PE conserva al menos 50 %, preferentemente 75 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente 95 % de la citotoxicidad de PE nativa. En una realización más preferida, el fragmento citotóxico es más tóxico que PE nativa.

La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) nativa es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular de 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de PE nativa se proporciona en la patente de los Estados Unidos de cesión común n.º 5.602.095. El método de acción es inactivación de la ADP ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2). La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan en concierto para provocar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media en la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la traslocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media en la ADP ribosilación del factor de elongación 2. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue sin estar definida, aunque una gran parte de él, los aminoácidos 365-380, puede suprimirse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall, *et al.*, (1989), mencionado anteriormente.

Las PE empleadas en la presente invención incluyen la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes modificadas de forma conservativa de la PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Se describen

variantes de PE útiles en la invención en los documentos US 7.355.012 y WO 2007/016150 y WO 2009/032954. Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen los que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico u otro posterior en la célula diana (por ejemplo, como una proteína o preproteína). Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35.

En realizaciones preferidas, la PE se ha modificado para reducir o eliminar la unión celular inespecífica, frecuentemente suprimiendo el dominio la como se enseña en la patente de los Estados Unidos n.º 4.892.827, aunque esto también puede conseguirse, por ejemplo, mutando determinados restos del dominio la. La patente de los Estados Unidos n.º 5.512.658, por ejemplo, desvela que una PE mutada en la que está presente el dominio la pero en la que los restos básicos del dominio la en las posiciones, 57, 246, 247 y 249 se reemplazan con restos ácidos (ácido glutámico o "E") muestra citotoxicidad no específica muy disminuida. Esta forma mutante de PE se denomina en ocasiones PE4E.

PE40 es un derivado truncado de PE como se ha descrito previamente en la técnica, con una supresión del dominio la de la molécula de PE nativa. Véase, Pai, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:3358-62 (1991); y Kondo, *et al.*, J. Biol. Chem. 263:9470-9475 (1988). PE35 es un fragmento carboxilo terminal de 35 kD de PE en el que los restos de aminoácidos 1-279 se han suprimido y la molécula comienza con una Met en la posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de PE nativa. Se desvelan PE35 y PE40, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.602.095 y 4.892.827. PE4E es una forma de PE donde todos los dominios de PE nativa están presentes, pero donde los restos básicos del dominio la en las posiciones 57, 246, 247 y 249 se reemplazan con restos ácidos (ácido glutámico o "E").

En algunas realizaciones preferidas, se emplea el fragmento citotóxico PE38. PE38 es una proproteína de PE truncada compuesta de los aminoácidos 253-364 y 381-613 que se activa en su forma citotóxica tras su procesamiento en una célula (véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.608.039, 7.355.012 y Pastan *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6 (1997)).

Como se ha observado anteriormente, parte o la totalidad del dominio Ib puede suprimirse, y las partes restantes unirse por un enlazador o directamente por un enlace peptídico. Puede suprimirse algo de la parte amino del dominio II. Además, el extremo C terminal puede contener la secuencia nativa de los restos 609-613 (REDLK) (SEQ ID NO: 5) o puede contener una variación que se ha descubierto que mantiene la capacidad de la construcción para traslocarse al citosol, tal como REDL (SEQ ID NO: 4) o KDEL (SEQ ID NO: 3) y repeticiones de estas secuencias. Véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.854.044; 5.821.238; y 5.602.095 y WO 99/51643. Aunque en realizaciones preferidas, la PE es PE4E, PE40 o PE38, cualquier forma de PE en la que la citotoxicidad inespecífica se haya eliminado o reducido hasta niveles en los que no se produzca toxicidad significativa a células no diana puede usarse en las inmunotoxinas de la presente invención siempre que siga teniendo capacidad de traslocación y ribosilación de EF-2 en una célula diana.

Variantes modificadas de forma conservativa de PE

Las variantes modificadas de forma conservativa de PE o fragmentos citotóxicos de las misma tienen al menos 80 % de similitud de secuencias, preferentemente al menos el 85 % de similitud de secuencias, más preferentemente al menos 90 % de similitud de secuencias y más preferentemente al menos 95 % de similitud de secuencias al nivel de aminoácidos, con la PE de interés, tal como PE38.

La expresión "variantes modificadas de forma conservativa" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos concretas, variantes modificadas de forma conservativa se refieren a las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde una alanina se especifica mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también describe todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Con respecto a secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altere, añada o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservativamente" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

Las exotoxinas de *Pseudomonas* empleadas en la invención pueden ensayarse con respecto al nivel deseado de citotoxicidad mediante ensayos bien conocidos por los expertos en la materia. Por lo tanto, los fragmentos citotóxicos de PE y variantes modificadas de forma conservativa de dichos fragmentos pueden ensayarse fácilmente con respecto a citotoxicidad. Puede ensayarse un gran número de moléculas de PE candidatas simultáneamente con respecto a citotoxicidad por métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden ensayarse subgrupos de las moléculas candidatas con respecto a citotoxicidad. Los subgrupos de reacción positiva de las moléculas candidatas pueden subdividirse de forma continua y volver a ensayarse hasta que se identifiquen el fragmento o los fragmentos citotóxicos deseados. Dichos métodos permiten la exploración rápida de grandes números de fragmentos citotóxicos o variantes conservativas de PE.

Inmunoconjugados de anti-CD22/PE

En una realización, el polipéptido de interés comprende un anticuerpo que se une de manera específica con CD22. "CD22" se refiere a un antígeno de linfocitos B restringido al linaje que pertenece a la superfamilia de Ig. Se expresa en el 60-70 % de linfomas de linfocitos B y leucemias y no está presente en la superficie celular en estadios tempranos del desarrollo de linfocitos B o en células madre. Véase, por ejemplo, Vaickus *et al.*, Crit. Rev. Oncol/Hematol. 11:267-297 (1991). En otra realización, el polipéptido de interés es un fragmento de anticuerpo que se une con CD22 (por ejemplo, Fab o scFv).

Como se usa en el presente documento, la expresión "anti CD22" en referencia a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente con CD22 e incluye referencia a un anticuerpo que se genera contra CD22. En algunas realizaciones, el CD22 es un CD22 de primate tal como CD22 humano. En una realización, el anticuerpo se genera contra CD22 humano sintetizado por un mamífero no primate después de la introducción en el animal de ADNc que codifica CD22 humano. En una realización adicional, el polipéptido de interés es un inmunoconjugado de anticuerpo CD22 que comprende la exotoxina PE38.

Un ejemplo de un inmunoconjugado de CD22/PE38 es CAT-8015 descrito en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 98/41641 y WO2003/27135, las patentes de los Estados Unidos n.º 7.541.034, 7.355.012 y la publicación de los Estados Unidos n.º 2007/0189962. CAT-8015 es una proteína de inmunotoxina recombinante compuesta de un fragmento Fv de anticuerpo basado en el anticuerpo anti-CD22 murino RFB4 fusionado con una forma truncada de la proteína de exotoxina de *Pseudomonas*, PE38. El fragmento Fv anti CD22 consiste en dos dominios, un V_L y V_H, donde este último se modificó para mejorar la unión con la diana de CD22 humano. La proteína CAT-8015 está comprendida por dos polipéptidos independientes, la cadena V_L (SEQ ID NO: 2) y la cadena V_H, fusionados en el extremo C terminal con el dominio PE38 (V_H-PE38) (SEQ ID NO:1). Otras secuencias de V_L y V_H-PE38 útiles en la presente invención se describen en los documentos US 7.541.034, 7.355.012 y 2007/0189962. Ambos dominios se diseñaron para contener cada uno restos de cisteína modificados técnicamente que permiten la formación de un enlace disulfuro intermolecular. Esta característica aumenta la estabilidad de la proteína de fusión.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad V_H-P38 (SEQ ID NO: 1) de CAT-8015 es la siguiente:

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
 AYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKS EDTAMYYCA
 RHSGYGTHWGVLFAYWQGTLVTVSAKASGGPEGGSLAALTAHQACHLP
LETFTTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA
SPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGP
ADSGDALLERNYPTGAEF LGDGDV SFSTRGTQNWTVERLLQAHRLQEE
RGYV FVG YHGTFLEAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYG
YAQDQEPDARGRI RN GALLRVYVPRSSLP GFYRTSLTLAAPEAAGEVER
LIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNV
GGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:1)

La secuencia de PE38 se muestra en negrita y el enlazador de cinco aminoácidos entre el dominio V_H y el dominio PE38 se muestra subrayado.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad V_L (SEQ ID NO: 2) de CAT-8015 es la siguiente:

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLI
 YYT SILHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT
 FCGGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

ES 2 678 204 T3

En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos del dominio VH del inmunoc conjugado es una de las siguientes:

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGTHWGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:6)

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGYNWGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:7)

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGTTWGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:8)

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGSTYGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:9)

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGTHWGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:10)

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPFSIYDMSWVRQTPEKCLEWV
AYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYICA
RHSGYGSYGVLFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:11)

5 En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos del dominio VL del inmunoc conjugado es una de las siguientes:

MDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIARYLNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSILHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT
FGCGTKLEIK (SEQ ID NO:12)

MDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIHGYNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSILHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT
FGCGTKLEIK (SEQ ID NO:13)

MDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIGRYLNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSILHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT
FGCGTKLEIK (SEQ ID NO:14)

ES 2 678 204 T3

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRGYLNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT
FGCGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

En otras realizaciones determinadas, la toxina PE del inmunoconjugado es una PE o variante de la misma seleccionada de las siguientes:

5

PE nativa

AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPAIADTNGQGVLYHYSMVL
EGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW
LNWLVPIGHEKPSNIKVF IHELNAGNQLSHMSP IYTIEMGDELLAKLAR
DATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQTQPRREKRWSEWASGKVL
CLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVIS
HRLHFPEGGLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRL
VALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDDLGEAIREQPEQARLALTLA
AAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDVS
FSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLEAAQSIVFGGVR
RSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPR
SLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETI
LGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQP
GKPPREDLK (SEQ ID NO:16)

10 PE40

GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAAR
LSWNQVDQVIRNALASPGSGDDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVR
QGTGNDEAGAANADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAFLG
DGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLEAAQSIVF
GGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVY
VPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRL
ETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYAS
QPGKPPREDLK (SEQ ID NO:17)

15 PE38

ES 2 678 204 T3

GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAAR
LSWNQVDQVIRNALASPGSGDDLGEAIREQPEQARLALTAAAAESERFVR
QGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWT
VERLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRG
FYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTL
AAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIP
SAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ
ID NO:18)

PE35

MWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDDLGEAI
REQPEQARLALTAAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYP
TGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLC
AAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN
GALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGP
EEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAIS
ALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:19)

5

PE-LR

RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQHRQLEERG
YVFGYHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGH
PLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLD
PSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:20)

10

PE-LR-6X

RHRQPRGWEQLPTGAEFLDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQHRQLEEGG
YVFGYHGTFLCAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDAAGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYATSLTLAAPEAAGEVERLIGH
PLPLRLDAITGPEEAGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLD
PSSIPDSEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:21)

15 PE-38 (CAT-8015)

PEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLA
 ARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERF
 VRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQN
 WTVERRLLQAHRQLEERGYVVFVGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLLDAIW
 RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSL
 TLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVV
 IPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
 (SEQ ID NO:22)

5 La toxina PE del inmunoconjugado se fusiona o conjuga con el dominio VH o VL directamente o mediante un enlazador en el extremo N o el extremo C del dominio VH o VL. Un ejemplo de un enlazador se ha descrito anteriormente para CAT-8015 y corresponde a la secuencia de aminoácidos KASGG (SEQ ID NO: 23). Los enlazadores adicionales pueden generarse fácilmente por técnicas conocidas en este campo.

Expresión de un inmunoconjugado de PE

10 El inmunoconjugado de PE empleado en la presente invención se expresa en células, tales como células bacterianas, y después se aísla de cuerpos de inclusión. El inmunoconjugado de PE aislado de cuerpos de inclusión se purifica adicionalmente después usando etapas de purificación corriente abajo.

15 Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vectores de expresión-hospedador para expresar el inmunoconjugado de PE empleado en la presente invención. Dichos sistemas de expresión-hospedador representa vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan una molécula de anticuerpo desvelada con la presente in situ. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico de la coliflor, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores procedentes del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K de virus vaccinia).

Se introduce ADN que codifica cada uno de los polipéptidos de toxina PE-VH y VL (por ejemplo, VH-PE38) en un vector de expresión por técnicas bien conocidas en este campo.

35 Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que actúa como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, con capacidad de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye vehículos para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Puede usarse un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores, tales como promotores inducibles, en genes, etc. Posibles vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos tales como pBR322 o derivados plasmídicos de pUC o el vector Bluescript. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ADN correspondientes a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado puede realizarse ligando los fragmentos de ADN apropiados en un vector elegido que tiene extremos cohesivos complementarios. Como alternativa, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos de ADN. Dichos vectores pueden modificarse técnicamente para contener genes marcadores seleccionables que posibilitan la selección de células. Dichos marcadores permiten la identificación y/o selección de células hospedadoras que expresan las proteínas codificadas por el marcador.

50 La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector, plásmido o vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada después de transformación en el hospedador. El gen clonado, es decir, la

5 secuencia de ácido nucleico insertada, por ejemplo, un gen que codifica un VH anti CD22, VL anti-CD22 o VH anti-CD22 o VL fusionado con una toxina PE, se sitúa habitualmente bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un potenciador o similares. Las regiones de control del inicio o promotores, que son útiles para conducir la expresión de un ácido nucleico en la célula hospedadora deseada son numerosos y conocidos para los expertos en la materia. Prácticamente cualquier promotor capaz de conducir la expresión de estos genes puede usarse en un vector de expresión, incluyendo, pero sin limitación, promotores víricos, promotores bacterianos, promotores animales, promotores mamíferos, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores relacionados con patogenicidad o enfermedad, promotores específicos del desarrollo, promotores inducibles, promotores regulados por luz; incluyendo, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40 (SV40), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), el E1A o promotor tardío principal (MLP) de adenovirus (Ad), el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor de timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), el promotor de IE1 de baculovirus, el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), el promotor de la gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor de la ubiquitina C (Ube), el promotor de la albúmina, las secuencias reguladoras de las regiones promotora de metalotioneína L y de control de la transcripción, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, β -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP y similares), los promotores de genes terapéuticos (del tipo MDR, CFTR o de factor VIII y similares), promotores relacionados con patogenicidad o enfermedad. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse mediante la adición de secuencias potenciadoras o reguladoras y similares.

25 El término "expresión" se refiere a la producción biológica de un producto codificado por una secuencia codificante. En la mayoría de los casos una secuencia de ADN, que incluye la secuencia codificante, se transcribe para formar un ARN mensajero (ARNm). El ARN mensajero se traduce después para formar un producto polipeptídico que tiene una actividad biológica relevante. Además, el proceso de expresión puede implicar además etapas de procesamiento para el producto de ARN de transcripción, tales como corte y empalme para retirar intrones y/o procesamiento postraduccional de un producto polipeptídico.

30 Los polipéptidos de VL y VH-PE38 se expresan en células, por ejemplo, células bacterianas, tales como *E. coli*. Los polipéptidos se expresan, por ejemplo, en células de *E. coli* y después se aíslan de cuerpos de inclusión. En determinadas realizaciones, las subunidades de VL y VH-PE38 se expresan en diferentes células. Por ejemplo, el VL se expresa en una célula en un primer vector y el VH-PE38 se expresa en una célula diferente en un segundo vector. Se recuperan y solubilizan cuerpos de inclusión de cada línea celular. En determinadas realizaciones, los cuerpos de inclusión se solubilizan a un pH en un intervalo de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,5. En realizaciones adicionales, los cuerpos de inclusión se solubilizan a un pH de 9,0, a un pH de 9,5, a un pH de 10,0 o un pH de 10,5. Los cuerpos de inclusión de VL y VH-PE38 solubilizados se combinan para formar un inmunoconjugado que comprende las subunidades de VL y VH-PE38.

40 En otras realizaciones, las subunidades de VL y VH-PE38 se expresan en la misma célula en diferentes vectores, por ejemplo, el VL se expresa en una célula en un primer vector y el VH-PE38 se expresa en la misma célula en un vector diferente. Se recuperan cuerpos de inclusión de la célula, se solubilizan y las subunidades de VL y VH-PE38 se combinan para formar un inmunoconjugado. En otras realizaciones determinadas, las subunidades de VL y VH-PE38 se expresan en el mismo vector en la misma célula.

45 Se utilizan etapas de cromatografía corriente abajo para purificar adicionalmente este inmunoconjugado.

Condiciones de cromatografía

50 Como se aprecia en la técnica, las condiciones de carga, lavado y elución para su uso en la cromatografía de la invención dependerán de los medios/ligandos de cromatografía específicos usados. El proceso de la invención puede, por supuesto, usarse en combinación con otras metodologías de purificación de proteínas, tales como precipitación salina, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía líquida de fase inversa o cualquier otra técnica de purificación de proteínas usada habitualmente. Se contempla, sin embargo, que el proceso de la presente invención eliminará o reducirá significativamente la necesidad de otras etapas de purificación.

60 También se realiza cromatografía de intercambio aniónico durante la separación cromatográfica del polipéptido de interés. Como es bien sabido en la técnica, los intercambiadores aniónicos pueden basarse en diversos materiales con respecto a la matriz así como los grupos con carga unidos. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes matrices, en las que los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: basados en agarosa (tales como SEPHAROSE Fast Flow® (tales como Q-SEPHAROSE FF) y SEPHAROSE High Performance®; basados en celulosa (tales como DEAE SEPHACEL®); basados en sílice y basados en polímeros sintéticos, o resinas tales como SuperQ-650 (de TOSOH BIOSEP) y Macro High Q (de BIO-RAD). Para la resina de intercambio aniónico, los grupos con carga que se unen covalentemente con la matriz pueden, por ejemplo, ser dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). En determinadas realizaciones, la resina se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación, Q Sepharose High Performance, Q Sepharose Fast Flow, DEAE

Sepharose Fast Flow, Capto Q, Capto DEAE, Toyopearl SuperQ 650 (M), Toyopearl SuperQ 650 (S), Toyopearl DEAE 650 (M), Toyopearl DEAE 650 (S), TSKgel SuperQ-5PW (30), TSKgel SuperQ-5PW (20), TSKgel DEAE-5PW (30), TSKgel DEAE-5PW (20), EMD Chemicals: Fractogel EMD DEAE (S), Fractogel EMD DEAE (M), Fractogel EMD DMAE (S), Fractogel EMD DMAE (M), Fractogel EMD TMAE (S), Fractogel EMD TMAE (M) y Baker Bond XWP500 PolyQuat-35, SPE. En una realización del presente proceso, la resina de intercambio aniónico empleada es Q-SEPHAROSE FF®.

Aunque cualquiera de estas resinas puede usarse para purificación a pequeña escala de anticuerpos, las resinas de determinado tamaño y menor coste son susceptibles a separación de escala de fabricación. Si el tamaño de la resina es demasiado pequeño, se genera contrapresión considerable generada en el sistema. Además, la cantidad del polipéptido que puede purificarse está limitada. Si la resina es costosa de producir o comprar, no es económicamente factible/práctica para su uso en la purificación a gran escala.

Por lo tanto, la resina usada en la presente invención debe ser de un determinado tamaño para proporcionar aumento de escala eficaz sin ser prohibitivamente caro. La "purificación en el nivel de fabricación" significa purificación de anticuerpos de una preparación recombinante en una escala que alcanza la producción a escala comercial. La resina usada en la etapa de predeterminación debería ser igual que la usada en el protocolo final para purificación en el nivel de fabricación debido a que no se puede predecir fácilmente la variación en condiciones necesarias para separar los agregados si se cambia la resina. Una resina particular que es útil en purificación a pequeña escala o de sobremesa puede no ser susceptible de purificación a gran escala. Dichas resinas útiles para la presente invención incluyen, por ejemplo, Q-SEPHAROSE HP. Sin embargo, el experto en la materia reconocería otras resinas de intercambio aniónico útiles para producción a escala comercial.

El volumen de resina usado cuando se empaqueta una columna de cromatografía de intercambio aniónico es reflejado por las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo de, por ejemplo, la cantidad de anticuerpo en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina usada.

Antes de realizar una cromatografía de intercambio aniónico, la resina de intercambio puede equilibrarse con un tampón. Cualquiera de una diversidad de tampones son adecuados para el equilibrado de resina de intercambio, por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio, TRIS(hidroximetil)aminometano, TRIS, fosfato, bis-TRIS y L-histidina. Los expertos en la materia apreciarán que pueden usarse numerosos otros tampones para el equilibrado siempre que el pH y la conductividad sean aproximadamente iguales que para la solución de anticuerpo aplicada. Cuando se realiza el proceso de "unión-depuración", los tampones de equilibrado y los tampones de lavado son los mismos. Cuando se realiza el proceso de "unión-elución", los tampones de elución pueden componerse de una o más sustancias tamponantes para controlar el pH. La sal utilizada es, por ejemplo, una sal altamente soluble, tal como cloruro de sodio o fosfato de potasio, pero puede usarse cualquier sal que mantenga la funcionalidad del anticuerpo y permite la retirada del monómero del anticuerpo de la resina.

Al realizar el proceso de "unión-elución", la elución de los monómeros de anticuerpos de la resina puede realizarse con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eluir eficazmente el anticuerpo monomérico, recuperando de este modo un eluato que contiene el anticuerpo, dejando al mismo tiempo los agregados unidos a la resina. En este contexto, la elución eficaz significa que al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 % o al menos 95 % del anticuerpo cargado en la resina se recupera. Solamente aproximadamente 1,0 %, preferentemente aproximadamente 0,5 %, más preferentemente menos de 0,1 % de agregados permanecen en la preparación de anticuerpos después del intercambio iónico.

Se describe con la presente el método en el que la elución se lleva a cabo como una elución de gradiente por etapas. En una realización, la elución se lleva a cabo en un gradiente lineal.

Sorprendentemente, las variantes desamidadas de las proteínas inmunoconjugadas se eluyeron a mayor concentración salina a pesar del aparente aumento neto de la carga negativa debido a desamidación de un resto de asparagina. Por lo tanto, estas variantes de potencia reducida se separaron de las proteínas más activas por la cromatografía de intercambio iónico descrita en el presente documento.

En determinadas realizaciones de la invención, de aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 99 % de la variante ácida o desamidada presente en la muestra de partida del polipéptido o inmunoconjugado se retira durante el proceso de purificación. En otras realizaciones, al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de la variante desamidada se retira. La composición que comprende el polipéptido o inmunoconjugado activo tiene por lo tanto menos de entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 1 % de especies desamidadas, por ejemplo, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 %.

Las variantes desamidadas de la invención incluyen inmunoconjugados que comprenden una toxina PE o variante de la misma, en los que la desamidación se produce en uno o más restos en el inmunoconjugado, por ejemplo, en uno o más restos en la toxina PE o variante de la misma. En determinadas realizaciones, se produce desamidación

en 1, 2, 3, 4 o 5 restos en el inmunoconjugado. En otras realizaciones, un inmunoconjugado que comprende una toxina PE o variante de la misma se desamida en 1, 2, 3, 4 o 5 restos en la toxina PE o variante de la misma, por ejemplo en la posición 358 de SEQ ID NO: 1, en la posición 495 de SEQ ID NO: 16, en la posición 243 de SEQ ID NO: 17, en la posición 227 de SEQ ID NO: 18, en la posición 200 de SEQ ID NO: 19, en la posición 212 de SEQ ID NO: 20, en la posición 212 de SEQ ID NO: 21 o en la posición 229 de SEQ ID NO: 22.

En una realización, la concentración salina del tampón de elución es suficientemente alta para desplazar los monómeros de anticuerpos de la resina sin desplazar los agregados. Sin embargo, se contempla que puede usarse un aumento del pH y una concentración salina menor para eluir los monómeros de anticuerpos de la resina.

Puede llevarse a cabo cualquiera o todas de las etapas cromatográficas de la presente invención por cualquier medio mecánico. Puede llevarse a cabo cromatografía, por ejemplo, en una columna. La columna puede procesarse con o sin presión y de la parte superior a la inferior o de la inferior a la superior. La dirección del flujo de líquido en la columna puede invertirse durante el proceso de cromatografía. La cromatografía también puede llevarse a cabo usando un proceso discontinuo en el que el medio sólido se separa del líquido usado para cargar, lavar y eluir la muestra por cualquier medio adecuado, incluyendo gravedad, centrifugación o filtración. También puede llevarse a cabo cromatografía poniendo en contacto la muestra con un filtro que absorbe o retiene algunas moléculas en la muestra más fuertemente que otros. En la siguiente descripción, las diversas realizaciones de la presente invención se describen en el contexto de cromatografía llevada a cabo en una columna. Se entiende, sin embargo, que el uso de una columna es únicamente una de varias modalidades cromatográficas que pueden usarse, y la ilustración de la presente invención usando una columna no limita la aplicación de la presente invención a cromatografía en columna, ya que los expertos en la materia pueden aplicar fácilmente las enseñanzas a otras modalidades también, tales como las que usan un proceso discontinuo o filtro.

Puede usarse una diversidad de diferentes condiciones de carga, lavado y elución, según se desee. En algunas realizaciones, las condiciones de carga iniciales se adaptan de modo que la proteína (por ejemplo, anticuerpo) eluida de la columna no HT inicial se aplique directamente a la columna HT.

Puede realizarse elución, por ejemplo, cambiando las condiciones salinas en la fase líquida. Por ejemplo, la sal y/o conductividad de la fase líquida se aumenta (linealmente o por etapas) hasta un punto en que eluye el anticuerpo. Las condiciones de lavado ejemplares incluyen, por ejemplo, fosfato 10 mM, pH 6,7, con elución realizada aumentando la concentración salina (por etapas o de modo lineal) (por ejemplo, hasta fosfato 10 mM, NaCl 1,5 mM, pH 6,7). Todas las diversas realizaciones u opciones descritas en el presente documento pueden combinarse en todas y cada una de las variaciones.

Antes de aplicarse la muestra a la columna, la columna puede equilibrarse en el tampón o la sal que se usará para cromatografiar la proteína. Como se analiza más adelante, puede realizarse cromatografía (y carga de la proteína para purificar) en una diversidad de tampones o sales incluyendo sales de sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, cloruro, fluoruro, acetato, fosfato y/o citrato y/o tampón de Tris. Los expertos en la materia prefieren tampones y sales de citrato por su facilidad de eliminación. Dichos tampones o sales pueden tener un pH de al menos aproximadamente 5,5. En algunas realizaciones, el equilibrado puede tener lugar en una solución que comprende un tampón de Tris o de fosfato de sodio. En algunas realizaciones, el equilibrado tiene lugar a un pH de al menos aproximadamente 5,5. El equilibrado puede tener lugar a pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,6, preferentemente a pH entre aproximadamente 6,5 y 7,5. Más preferentemente, la solución comprende un tampón de fosfato de sodio a una concentración de aproximadamente 25 milimolar y a un pH de aproximadamente 6,8.

El proceso de purificación de proteínas de la presente invención es aplicable a la retirada de una variante ácida de cualquier proteína. Algunas proteínas contempladas específicamente para su uso con la invención incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos. Otras proteínas incluyen, pero sin limitación proteínas de fusión recombinantes que comprenden uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpos constantes, opcionalmente una parte Fc de un anticuerpo y una proteína de interés.

Formulaciones

Se preparan formulaciones de los polipéptidos o inmunoconjugados purificados para almacenamiento y uso combinando un polipéptido o inmunoconjugado purificado empleado en la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, transportador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, tampones no tóxicos, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos, tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA;

azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

- 5 Las composiciones de anticuerpo y/o inmunoconjugado descritas con la presente (es decir, PE unida a un anticuerpo), son particularmente útiles para administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal o luz de un órgano. Las composiciones para administración comprenderán habitualmente una solución del anticuerpo y/o inmunoconjugado disuelto en un transportador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un transportador acuoso. Se puede usar una diversidad de transportadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia no deseada. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de líquido, las viscosidades, el peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y con las necesidades del paciente.
- 20 Por lo tanto, una composición de inmunoconjugado farmacéutica típica para administración intravenosa estaría a un tratamiento total de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 50 µg/kg al día, en particular 20-50 µg/kg al día con la dosificación administrada preferentemente de forma continua o distribuida en tres veces al día. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

La composición que incluye el inmunoconjugado desvelado por la presente puede administrarse para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones a un paciente que padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de salud del paciente.

35 Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y la frecuencia según lo necesite y tolere el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas desveladas con la presente para tratar eficazmente al paciente. La dosificación puede administrarse tres veces al día cada dos días o continuamente cada dos días durante un ciclo de, por ejemplo, 21 días, pero puede aplicarse periódicamente hasta que se consigue un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios requieren detener la terapia. En general, la dosis debería ser suficiente para tratar o aliviar síntomas o señales de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al paciente. Una cantidad eficaz de la compuesta es la que proporciona al sujeto alivio de un síntoma o síntomas o una mejora identificable de manera objetiva observada por el especialista clínico u otro observador cualificado.

45 El inmunoconjugado puede formularse como una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente aceptable. Las formulaciones de inmunoconjugado CAT-8015 farmacéuticamente aceptables incluyen CAT-8015 de 0,5 mg/ml a 2,5 mg/ml, habitualmente 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml o 1,5 mg/ml en fosfato de sodio 25 mM, sacarosa 4 %, glicina 8 %, polisorbato 80 (PS80) 0,02 %, pH 7,4. En realizaciones adicionales, el fosfato de sodio puede estar en un intervalo de 20 mM a 100 mM, 25 mM a 50 mM o 25 mM a 35 mM; la sacarosa puede estar a 2 %, 3 %, 4 %, 5 % o 6 %; la glicina puede estar en el intervalo de 5-10 %, habitualmente, 5 %, 6 % o 7 %; el polisorbato 80 puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1 %, habitualmente 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 % o 0,05 %; con una pH en el intervalo de 6,5 a 8,0, habitualmente a pH 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6. También pueden utilizarse otros agentes tamponantes conocidos por los expertos en la materia.

55 La formulación puede estar liofilizada. El término "liofilizada" se refiere a cualquier composición o formulación que se prepare en forma seca por congelación y deshidratación rápida, en el estado congelado a alto vacío. "Liofilizar" o "liofilización" se refiere a un proceso de congelación y secado de una solución. Las formulaciones o composiciones liofilizadas se preparan con frecuencia para su uso o se reconstituyen mediante la adición de agua destilada estéril. La formulación liofilizada puede reconstituirse en un vial.

60 Para administración intravenosa, una formulación como se describe con la presente, tal como una formulación líquida o una formulación reconstituida a partir de una formulación liofilizada puede colocarse en un vial en el que el inmunoconjugado en la formulación está presente a concentraciones como se ha descrito anteriormente. Esta formulación se extrae del vial y se añade a una solución de bolsa intravenosa (IV), donde la bolsa IV contiene de aproximadamente 30 ml a aproximadamente 100 ml de solución, habitualmente 50 ml, 60 ml, 70 ml u 80 ml. Una "solución protectora" de bolsa IV separada también puede añadirse al volumen total de la bolsa IV donde la solución

5 protectora contiene polisorbato 80 en una cantidad tal que el polisorbato 80 presente en la solución de bolsa IV final
 10 esté en un intervalo de 0,001 % a aproximadamente 3 % de polisorbato 80, habitualmente en el intervalo de
 aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1 % y más habitualmente a 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 % o
 0,05 %. La solución protectora puede preformularse en un vial tal que el polisorbato 80 esté a una concentración de
 aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % y puede ser de 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %,
 4,0 %, 4,5 % o 5,0 %. La solución protectora evita la adsorción del inmunoc conjugado o fármaco (por ejemplo, CAT-
 8015) en superficies de contacto de la bolsa IV, evitando o inhibiendo de este modo que el inmunoc conjugado o
 fármaco se pegue a la bolsa IV durante la administración y permitiendo que el paciente reciba la dosificación
 apropiada de inmunoc conjugado o fármaco. La solución de bolsa IV puede administrarse por infusión al paciente
 durante diversas duraciones, habitualmente de 30 minutos a 1 hora, habitualmente 30 minutos.

15 Entre diversos usos de los inmunoc conjugados y las formulaciones descritos con la presente se incluyen una
 diversidad de condiciones de enfermedad provocadas por células humanas específicas que pueden eliminarse
 mediante la acción tóxica de la proteína. Una aplicación para los inmunoc conjugados descritos con la presente es
 para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B o linfocitos B malignos que expresan CD22. Las
 neoplasias malignas de linfocitos B ejemplares incluyen leucemia linfocítica crónica B (LLC-B), leucemia linfocítica
 aguda pediátrica (LLAp), linfoma folicular (LF), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGL), linfoma no
 hodgkiniano (LNH) y leucemia por tricoleucitos (LTL).

20 Ejemplos

Ejemplo 1. Expresión, recuperación y aislamiento de cuerpos de inclusión de CAT-8015

25 Se realizó fermentación de líneas celulares separadas que contienen vectores de expresión de CAT-8015 VL y CAT-
 8015 VH-PE38. El fermentador se recogió por centrifugación continua. La recogida del fermentador se pasó a través
 de una centrífuga continua a 2 a 8 °C a una velocidad de 0,5 a 0,8 l por minuto y se centrifugó a una velocidad de
 aproximadamente 15.000 rpm. Después de centrifugación la pasta celular se congeló a ≤ -70 °C.

30 Después de este tratamiento, las pastas celulares V_H -PE38 y V_L se descongelaron durante 12 a 24 horas a 2 a 8 °C.
 Las células se lisaron para liberar cuerpos de inclusión que contienen los productos de VL VH-PE38. Los cuerpos de
 inclusión resultantes se solubilizaron posteriormente y se obtuvieron los productos de V_H -PE38 y V_L .

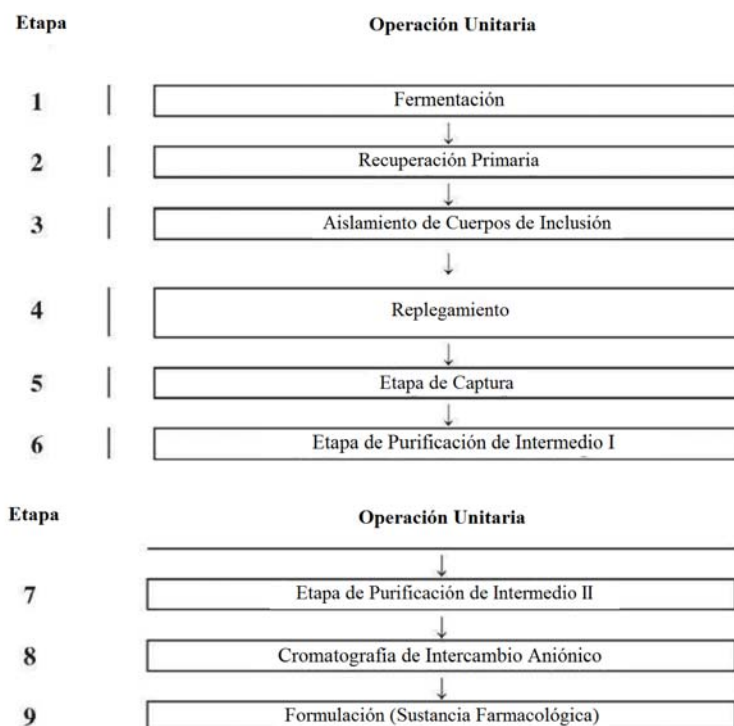
35 El producto se concentró hasta aproximadamente 1 mg/ml (determinado por ensayo de proteína total de Coomassie)
 usando un cartucho de fibras huecas de ultrafiltración de 30 kDa. El material retenido se diafiltró después con 5 a 6
 volúmenes de Tris 20 mM, urea 100 mM pH 7,4 para conseguir una conductividad de 2,5 a 3,0 mS/cm. Este
 producto se almacenó hasta 72 horas a 2 a 8 °C.

40 Ejemplo 2. Purificación a escala analítica de CAT-8015 activo mediante cromatografía de intercambio aniónico con
 resinas de alto rendimiento.

45 La expresión de la subunidad V_H -P38 dio como resultado una formación de una variante desamidada de la
 subunidad. Se descubrió que la desamidación se produjo en la parte PE38 del inmunoc conjugado. La desamidación
 de la subunidad V_H -P38 dio como resultado reducción de la potencia de la proteína CAT-8015. Sorprendentemente,
 las condiciones cromatográficas descritas posteriormente fueron exitosas en la retirada de la variante desamidada,
 proporcionando de este modo la capacidad de retirar la especie inactiva durante la purificación. Ya que la
 desamidación se produjo en la parte PE38 de la construcción de fusión, las condiciones cromatográficas pueden
 aplicarse a la retirada de cualquier variante desamidada de un conjugado de PE.

50 CAT-8015 se renaturalizó a partir de cuerpos de inclusión aislados y se purificaron posteriormente por un proceso de
 4 columnas. La Tabla 1 proporciona una visión de conjunto de las operaciones de unidades de renaturalización y
 purificación.

Tabla 1 diagrama de flujo de producción de CAT-8015



La Figura 1 muestra el perfil de cromatografía de intercambio iónico (IEC) analítico de una muestra de un patrón de referencia de CAT-8015. Como se muestra en el perfil, un pico previo surge antes de la elución del pico principal. Las fracciones individuales eluidas de la IEC se ensayan con respecto a actividad biológica de CAT-8015 en relación con un patrón de referencia usando un bioensayo de apoptosis que mide la capacidad de la muestra de ensayo para inducir muerte apoptótica dependiente de dosis de la línea celular Daudi que expresa receptor de CD22. Una vez unido a CD22 e internalizado, CAT-8015 induce que células Daudi experimenten apoptosis mediante activación de caspasa 3/7 que puede medirse mediante el sistema de ensayo de caspasa-GloTM 3/7. La potencia de la muestra de ensayo se determina dividiendo la concentración eficaz al 50 % (CE50) del patrón de referencia por la CE50 de la muestra de ensayo. Los resultados del bioensayo de apoptosis demostraron que la potencia relativa de CAT-8015 está correlacionada con el porcentaje de pico previo de CAT-8015 como se representa gráficamente en la Figura 1. La Figura 2 muestra la correlación entre esta potencia relativa y el porcentaje del pico previo.

Se recogieron fracciones de pico previo y pico principal de análisis de IEC múltiple, se agruparon y se sometieron a mapeo de péptidos y análisis por espectrometría de masas- cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los resultados se compararon con los obtenidos de experimentos de mapeo de péptidos y LC-MS/MS de CAT-8015 purificado. El análisis de sustancia farmacológica CAT-8015 purificada reveló que Asn-358 estaba parcialmente desamidada a Asp-358 e iso-Asp-358 (Tabla 2). Se descubrió que Asp-358 e iso-Asp358 estaban significativamente enriquecidas en la fracción de pico previo mientras que la fracción de pico principal estaba enriquecida en CAT-8015 (Tabla 2). En conjunto, los resultados demuestran que la desamidación en Asn-358 conduce a una pérdida de potencia relativa en un bioensayo basado en células. El resto de Asp-358 está presente en la parte de toxina PE del inmunoconjugado lo que indica por lo tanto que un inmunoconjugado que contiene una toxina PE, o variante de la misma, en la que esté presente Asp-358 probablemente esté sujeto a desamidación y sujeto a una pérdida de potencia o actividad.

Tabla 2

Distribución del aminoácido 358 en fracciones de sustancia farmacológica, pico previo y pico principal de CAT-8015 basándose en el análisis de mapeo de péptidos y LC-MS/MS.			
Aminoácido	Sustancia farmacológica (%)	Pico previo (%)	Pico principal (%)
N358	78,1	3,1	88,9
D358	11,9	44,0	2,2
iso-D358	10,0	52,9	8,9

D358 = Asn-358 desamidada; iso-D358 = Asn-358 iso-desamidada; N358 = Asn-358.

Se realizó separación de CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto mediante cromatografía de intercambio aniónico con grupos de intercambio iónico fuertes tales como Q (amino cuaternario) acoplados con resinas de diámetro pequeño tales como Source 15 (diámetro de partícula: 15 µm; GE Healthcare) y Sepharose High Performance (diámetro de partícula: 34 µm; GE Healthcare). La aplicación de resina de cromatografía de diámetro pequeño en procesos de biofabricación se complica por la generación de contrapresiones significativas en condiciones operativas típicas como se define por la geometría de columna, caudales y composición del tampón. Basándose en estas consideraciones y el requisito de una etapa de cromatografía de alto rendimiento de eligió Q Sepharose High Performance para la separación de CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto. Se desarrollaron condiciones de cromatografía que consiguieron alta resolución manteniendo al mismo tiempo la operabilidad a diversas escalas de fabricación.

Ejemplo 3. Purificación a escala de laboratorio de CAT-8015

La columna se preequilibró en primer lugar con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón C (tampón de preequilibrado/retirada: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 1,0 M) y se equilibró posteriormente con 5 VC de tampón A (tampón de equilibrado: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0) a caudal lineal de 100 cm/h. La resina de cromatografía fue Q Sepharose High Performance (QHP, GE Healthcare) en una columna Millipore Vantage, de 2,2 cm x 19,5 cm, y se procesó en un AKTA Explorer. El grupo de producto de purificación intermedio se preparó para carga en la columna de intercambio aniónico de alto rendimiento por diafiltración con 10 volúmenes de tampón A usando una membrana de PCPM de 10 kDa. El grupo de producto de interacción hidrófoba diafiltrado se cargó en la columna QHP a un caudal lineal de 100 cm/h, seguido de una etapa de reequilibrado de 2 VC con tampón A al mismo caudal. CAT-8015 se eluyó con un gradiente lineal de 10 VC de tampón B 35 % (tampón de elución: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM) a tampón B 55 % a un caudal lineal de 100 cm/h. La elución del producto se supervisó a 280 nm. Se recogieron fracciones y se analizaron con respecto a % de pico previo mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) analítica. Las fracciones que contenían menos del 25 % de pico previo se agruparon. El grupo de QHP se analizó con respecto a % de pico previo mediante IEC analítica en una columna de intercambio aniónico fuerte. Se midió la potencia relativa mediante un bioensayo de apoptosis como se ha descrito anteriormente.

A pH 8,0, CAT-8015 se unió fuertemente con la resina de intercambio aniónico sin ninguna proteína detectada en la fracción de flujo continuo por absorbancia a A280. Después de una etapa de lavado inicial con NaCl 175 mM en Tris/HCl, pH 8,0, CAT-8015 se eluyó de la columna con un gradiente salino lineal de B 35 % (NaCl 175 mM en Tris/HCl, pH 8,0) a B 55 % (NaCl 275 mM en Tris/HCl, pH 8,0). CAT-8015 se eluyó de la columna entre B 39 % (NaCl 192 mM en Tris/HCl, pH 8,0) y B 49 % (NaCl 245 mM en Tris/HCl, pH 8,0). La Fig. 3 muestra el perfil de cromatografía de QHP de CAT-8015.

Las fracciones se analizaron mediante IEC analítica. La Tabla 3 muestra los resultados para fracciones eluidas entre B 44,5 % (NaCl 223 mM) y B 47,2 % (NaCl 236 mM).

Tabla 3

Análisis por IEC de fracciones de QHP recogidas		
N.º de fracción	% de pico previo ^a	% de pico principal
C12	41,0	59
D12	34,5	65,5
D11	27,0	73
D9	17,6	82,4
D7	15,9	84,1
D5	18,7	81,3
D3	21,9	78,1

^aEl pico previo contiene >90 % de CAT-8015 desamidado.

La Tabla 3 demuestra que la cromatografía de intercambio aniónico realizada en un modo de elución de gradiente salino lineal es capaz de separar CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto de una manera eficaz.

Sorprendentemente, CAT-8015 intacto se eluyó a una mayor concentración salina a pesar del aparente aumento neto de la carga negativa debido a desamidación de un resto de asparagina. Este resultado es coherente con el perfil de cromatografía observado por IEC. Se inyectaron muestras que contenían CAT-8015 en una columna de intercambio aniónico analítica (PL-SAX, Varian) equilibrada a pH 8,0 con un sistema de tampón de Tris/HCl y se eluyeron por una combinación de etapa y etapas de elución de gradiente (Fig. 1).

Las fracciones se combinaron según los criterios de agrupamiento de menos del 25 % de contenido de pico previo. El grupo de QHP se analizó con respecto a % de pico previo y potencia relativa mediante SDS-PAGE, IEC analítica y bioensayo de apoptosis. El análisis por SDS-PAGE, como se muestra en la Fig. 4, demuestra que las muestras de grupo de carga y eluato de QHP contenían CAT-8015 altamente purificado. Sin embargo, el grupo de carga de QHP no cumplió la especificación objetivo para pureza por IEC y bioactividad. Las mediciones de pureza y potencia para el grupo de carga de QHP en comparación con el grupo de eluato de QHP, como se presenta en la Tabla 4 posterior, demuestran que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico con QHP dio como resultado un aumento significativo de la pureza por IEC y la potencia relativa de CAT-8015. El grupo de carga de QHP se generó a partir de la etapa de purificación de intermedio II.

Tabla 4

Pureza de CAT-8015 por IEC y bioactividad			
Etapa	% de pico previo	% de pico principal	Potencia relativa (%)
Grupo de carga de QHP	53,8	46,2	52
Grupo de Eluato de QHP	16,5	83,8	80

El grupo de producto de QHP se diafiltró posteriormente en tampón de formulación para generar sustancia farmacológica de CAT-8015.

Por lo tanto, la fabricación de sustancia farmacológica de CAT-8015 requiere la separación de CAT-8015 desamidado de CAT-8015 activo. La capacidad de cromatografía de intercambio aniónico con resinas de alto rendimiento tales como QHP para separar CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto y para aumentar la bioactividad hasta especificaciones objetivo es un prerrequisito para la fabricación exitosa de sustancia farmacológica de CAT-8015.

Ejemplo 4. Purificación a gran escala de CAT-8015

La columna se preequilibró en primer lugar con 5 VC de tampón C (tampón de preequilibrado/retirada: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 1,0 M) a un caudal lineal de 66 cm/h y posteriormente se equilibró con 5 VC de tampón A a un caudal lineal de 76 cm/h. La resina de cromatografía fue Q Sepharose High Performance (QHP, GE Healthcare), en un lecho de columna BP300, de 30 cm x 22 cm, procesado en un instrumento K Prime. El grupo de producto de purificación intermedio se preparó para carga en la columna de intercambio aniónico de alto rendimiento por diafiltración con 10 volúmenes de tampón A (tampón de equilibrado: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0) usando una membrana de PCPM 10 kDa. El grupo de producto diafiltrado se cargó en la columna QHP a un caudal lineal de 64 cm/h, seguido de una etapa de reequilibrado de 2 VC con tampón A a 76 cm/h. CAT-8015 se eluyó con un gradiente lineal de 10 VC de tampón B 35 % (tampón de elución: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM) a tampón B 55 % a un caudal lineal de 76 cm/h. La elución del producto se supervisó a 280 nm. Se recogieron fracciones y se analizaron con respecto a % de pico previo mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) analítica. Las fracciones que contenían menos del 25 % de pico previo se agruparon. El grupo de QHP se analizó con respecto a % de pico previo mediante IEC analítica en una columna de intercambio aniónico fuerte. Se midió la potencia relativa mediante un bioensayo de apoptosis.

Se realizó cromatografía de intercambio aniónico a gran escala de CAT-8015 con QHP como se ha descrito anteriormente. La purificación por QHP se llevó a cabo a caudales reducidos debido a restricciones de equipamiento. CAT-8015 eluido de la columna a conductividades entre 22,3 mS/cm y 26,4 mS/cm. La Figura 5 muestra el perfil de cromatografía de QHP de CAT-8015 purificado según el método descrito anteriormente.

Las fracciones se analizaron mediante IEC analítica. La Tabla 5 muestra los resultados para fracciones eluidas a conductividades entre 23,8 y 25,4 mS/cm. La Tabla 5 demuestra que la cromatografía de intercambio aniónico realizada en un modo de elución de gradiente salino lineal fue capaz de separar CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto. La separación de CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto tuvo lugar en un intervalo de conductividad de menos de 2 mS/cm.

Tabla 5

Análisis por IEC de % de pureza de pico previo de fracciones recogidas		
Fracción	% de pico previo	% de pico principal
1	55,1	44,9
2	39,0	61
3	30,1	69,9

4	25,1	74,9
5	18,7	81,3
6	14,7	85,3
7	16,4	83,6

5 Las fracciones 4-7 se combinaron según los criterios de agrupamiento de menos del 25 % de contenido de pico previo. El grupo de QHP se analizó con respecto a % de pico previo y potencia relativa mediante SDS-PAGE y SEC, IEC analítica y bioensayo de apoptosis. El análisis por SDS-PAGE, como se muestra en la Fig. 6, demuestra que las muestras de grupo de carga y eluato de QHP contenían CAT-8015 altamente purificado. Sin embargo, el grupo de carga de QHP no cumplió la especificación objetivo para pureza por SEC, IEC y potencia relativa. Las mediciones de pureza y potencia para el grupo de carga de QHP en comparación con el grupo de eluato de QHP, como se presenta en las Tablas 6 y 7 posteriores, demuestran que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico con QHP dio como resultado un aumento significativo de la pureza por SEC, IEC y potencia relativa de CAT-8015. El grupo de carga de QHP se generó a partir de la etapa de purificación de intermedio II.

Tabla 6

Pureza de CAT-8015 por SEC			
Etapas	% de monómero	% de agregado	% de otros
Grupo de carga de QHP	92,7	0,7	6,6
Grupo de Eluato de QHP	99,0	1,0	0

Tabla 7

Pureza de CAT-8015 por IEC y bioactividad			
Etapas	% de pico previo	% de pico principal	Potencia relativa (%)
Grupo de carga de QHP	50,3	49,7	51
Grupo de Eluato de QHP	17	83	75

15 El grupo de producto de QHP se diafiltró posteriormente en tampón de formulación para generar sustancia farmacológica de CAT-8015.

20 Los ejemplos 2-4 demuestran la capacidad de la cromatografía de intercambio aniónico con resinas tal como Q Sepharose High Performance para separar CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto y para aumentar su potencia relativa para cumplir las especificaciones objetivo (véase Tablas 4 y 6). CAT-8015 desamidado difiere de CAT-8015 intacto por una carga negativa adicional. A diferencia del comportamiento de elución esperado de una columna de intercambio aniónico, la mayor parte del CAT-8015 desamidado eluye antes que el CAT-8015 intacto en condiciones de elución en gradiente salino (véase Tablas 3 y 5). Este patrón de elución inesperado se observó a escala analítica, escala de laboratorio y cromatografía de intercambio aniónico a gran escala. Este patrón de elución era inesperado ya que se esperaba que el tampón de elución de alta salinidad lineal diera como resultado una carga negativa mayor de la variante. Por lo tanto, los ejemplos 2-4 demuestran que usando un tampón de elución lineal, puede retirarse una especie desamidada de inmunoconjugados activos usando cromatografía de intercambio aniónico. La separación de CAT-8015 desamidado de CAT-8015 intacto tuvo lugar en un intervalo particular de conductividades, subrayando la necesidad de resinas de intercambio aniónico de alta resolución, el control cuidadoso de las condiciones de elución y el ensayo en proceso de fracciones recogidas.

Ejemplo 5. Modificación de la bioactividad de formulaciones de CAT-8015

35 La potencia de las composiciones de CAT-8015 se calibró mezclando cantidades específicas del pico previo desamidado con el pico principal activo. Para obtener composiciones que comprendieran una potencia particular de CAT-8015, se combinaron alícuotas de producto de pico previo de CAT-8015 con alícuotas de producto de pico principal de CAT-8015 para conseguir una composición con una potencia particular de CAT-8015. Controlando el nivel de potencia de CAT-8015 en la composición, se generó una formulación de CAT-8015 para administración de un volumen particular de CAT-8015 reconstituido a una dosis deseada.

Ejemplo 6. El ajuste del pH durante la solubilización da como resultado especies de desamidación reducida como se mide después de las etapas de captura y purificación de intermedio

45 Aunque pueden retirarse especies desamidadas de inmunoconjugados activos usando las etapas de purificación como se ha descrito anteriormente, los niveles de especies desamidadas de CAT-8015 también pueden reducirse

eficazmente ajustando el pH en etapas anteriores en el proceso de purificación (es decir, la etapa de replegamiento (etapa 4 de la Tabla 1 anterior). El procedimiento de replegamiento utilizado para conseguir un nivel menor de especies desamidadas de CAT-8015 incluye las siguientes subetapas:

5 Subetapa de replegamiento 1: Solubilización. Clarificación y concentración: Se descongelaron cuerpos de inclusión de VH-PE38 y VL durante 12-24 horas a temperatura ambiente (15-30 °C). Los cuerpos de inclusión de VH-PE38 y VL se combinaron en una relación molar 1:1 y se ajustaron hasta 15 % (p/v) de sólidos añadiendo Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,4. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron añadiendo 5 kg del tampón de solubilización de cuerpos de inclusión (etanolamina 50 mM, urea 8 M, arginina 0,5 M, EDTA 2 mM, DTE 10 mM) para cada kg de 15 % (p/v) de sólidos de suspensión de cuerpos de inclusión. El pH del tampón de solubilización de cuerpos de inclusión se modificó entre pH 9,0 y 10,5 en incrementos de 0,5 unidades de pH. Se llevó a cabo solubilización durante 2 horas a temperatura ambiente (15-30 °C) con agitación constante. Los cuerpos de inclusión solubilizados se clarificaron por filtración en profundidad a través de una serie de filtros. El filtrado clarificado se concentró por filtración de flujo tangencial hasta 5-6 g/l usando una membrana de ultrafiltración de punto de corte de peso molecular (PCPM) de 5 kDa.

10 Subetapa de replegamiento 2: Replegamiento: El replegamiento de CAT-8015 se inició por una dilución de 10 veces del filtrado de cuerpos de inclusión clarificado y concentrado en tampón de replegamiento preenfriado (2-8 °C) (etanolamina 50 mM, arginina 1 M, EDTA 2 mM, glutatión oxidado 0,91 mM, pH 9,5). La solución de replegamiento se mantuvo a 2-8 °C durante 48-72 horas con mezclado continuo. El replegamiento se terminó llevando la solución de replegamiento a temperatura ambiente (15-30 °C) antes de la concentración y diafiltración. La solución de replegamiento se concentró por filtración de flujo tangencial con una membrana de PCPM 10 kDa y se diafiltró con 10 volúmenes de fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4. La solución de replegamiento concentrada y diafiltrada se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (carga de TMAE).

15 Como parte de la etapa de captura (etapa 5 de la Tabla 1 anterior), la preparación de CAT-8015 obtenida del procedimiento de replegamiento anterior se cargó en una columna Fractogel TMAE (EMD Biosciences o equivalente) equilibrada con fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4. Después de la carga, la columna se lavó en primer lugar con fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4, y después con fosfato de potasio 20 mM, Triton X 100 0,1 % (p/p), pH 7,4, seguido de un lavado posterior con fosfato de potasio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,4. El producto se eluyó de la columna en flujo inverso con fosfato de potasio 20 mM, cloruro de sodio 200 mM pH 7,4. La columna se retiró con cloruro de sodio 2 M, se limpió con hidróxido de sodio 1 N y se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N a temperatura ambiente.

20 Como parte de la etapa de purificación intermedia 1, se realizó cromatografía de hidroxiapatita. La etapa de cromatografía de hidroxiapatita se realizó como una etapa de cromatografía de flujo continuo. El producto obtenido de la etapa de captura anterior se cargó directamente sin ningún ajuste adicional en una columna de hidroxiapatita de cerámica (Bio-Rad Laboratories o equivalente) equilibrada con fosfato de potasio 400 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 7,4, seguido de fosfato de potasio 20 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 7,4. En las condiciones de la cromatografía, el producto se recogió en la fracción de flujo continuo (producto de HA). La columna se retiró con fosfato de potasio 400 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 7,4, se limpió con hidróxido de sodio 1 N y se almacenó en hidróxido de sodio 0,1 N a temperatura ambiente.

25 El porcentaje de pico previo en el producto de HA anterior se analizó por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento. La Tabla 8 y la Figura 7 muestran el porcentaje de pico previo en producto de HA en función del pH de solubilización. Como se muestra en la Tabla 8 y la Figura 7, la solubilización de los cuerpos de inclusión de VH-PE38 y VL a un pH menor conduce a menos producto de CAT-8015 desamidado. La capacidad de control de la desamidación de CAT-8015 en una etapa temprana en el proceso de renaturalización y purificación puede aumentar el rendimiento del proceso general manteniendo al mismo tiempo la calidad de la sustancia farmacológica purificada final.

Tabla 8

Porcentaje de pico previo en el producto HA en función del pH de solubilización				
pH de solubilización	9,0	9,5	10,0	10,5
Pico previo (%)	9,8	14,5	22,1	31,8

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polipéptido purificado de una solución que comprende el polipéptido y una variante ácida del polipéptido, en el que dicha variante ácida del polipéptido da como resultado una inhibición de la potencia de dicho polipéptido, comprendiendo el método: (a) poner en contacto el polipéptido con una matriz de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX); y (b) eluir el polipéptido unido de la matriz de cromatografía AIEX con un gradiente salino lineal que sea de aproximadamente NaCl 150 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 300 mM en Tris/HCl, pH 8,0, de aproximadamente NaCl 175 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 275 mM en Tris/HCl, pH 8,0 o de aproximadamente NaCl 192 mM en Tris/HCl, pH 8,0 a aproximadamente NaCl 245 mM en Tris/HCl, pH 8,0, separando de este modo dicho polipéptido de la variante ácida y produciendo un polipéptido purificado; en el que el polipéptido es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con el receptor de superficie celular CD22 y que comprende una exotoxina de *Pseudomonas*, o variante de la misma.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la variante ácida es una variante desamidada.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz AIEX contiene grupos de intercambio iónico de amina cuaternaria y amina terciaria.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la matriz AIEX contiene un grupo amino cuaternario (Q).
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que la matriz AIEX es Q sepharose.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que entre aproximadamente 75 y aproximadamente 99 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de la variante ácida o desamidada se retira.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv monocatenario o scFv, un Fv con enlaces disulfuro, un dominio V-NAR, un IgNar, un intracuerpo, una IgGΔCH2, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, DVD-Ig, Fcab, mAb², un (scFv)₂, o un scFv-Fc.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha exotoxina de *Pseudomonas*, o variante de la misma, tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 a 22.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de VH y VL.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de VH se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a 11.
11. El método de la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de VL se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 12-15.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el inmunocombinado es la inmunotoxina CAT-8015 que comprende la subunidad V_H-PE38 de SEQ ID NO: 1 y la subunidad V_L de SEQ ID NO: 2.
13. Un método para modificar la bioactividad de una solución polipeptídica que comprende un polipéptido y una variante desamidada, en el que el polipéptido es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con el receptor de superficie celular CD22 y que comprende una exotoxina de *Pseudomonas* o variante de la misma, comprendiendo el método separar el polipéptido de la variante desamidada por cromatografía AIEX de elución lineal; y combinar el polipéptido purificado y la variante desamidada en cantidades fijas para obtener la bioactividad deseada de la solución polipeptídica.

FIG. 1
Perfil de cromatografía de intercambio iónico del patrón de referencia CAT-8015

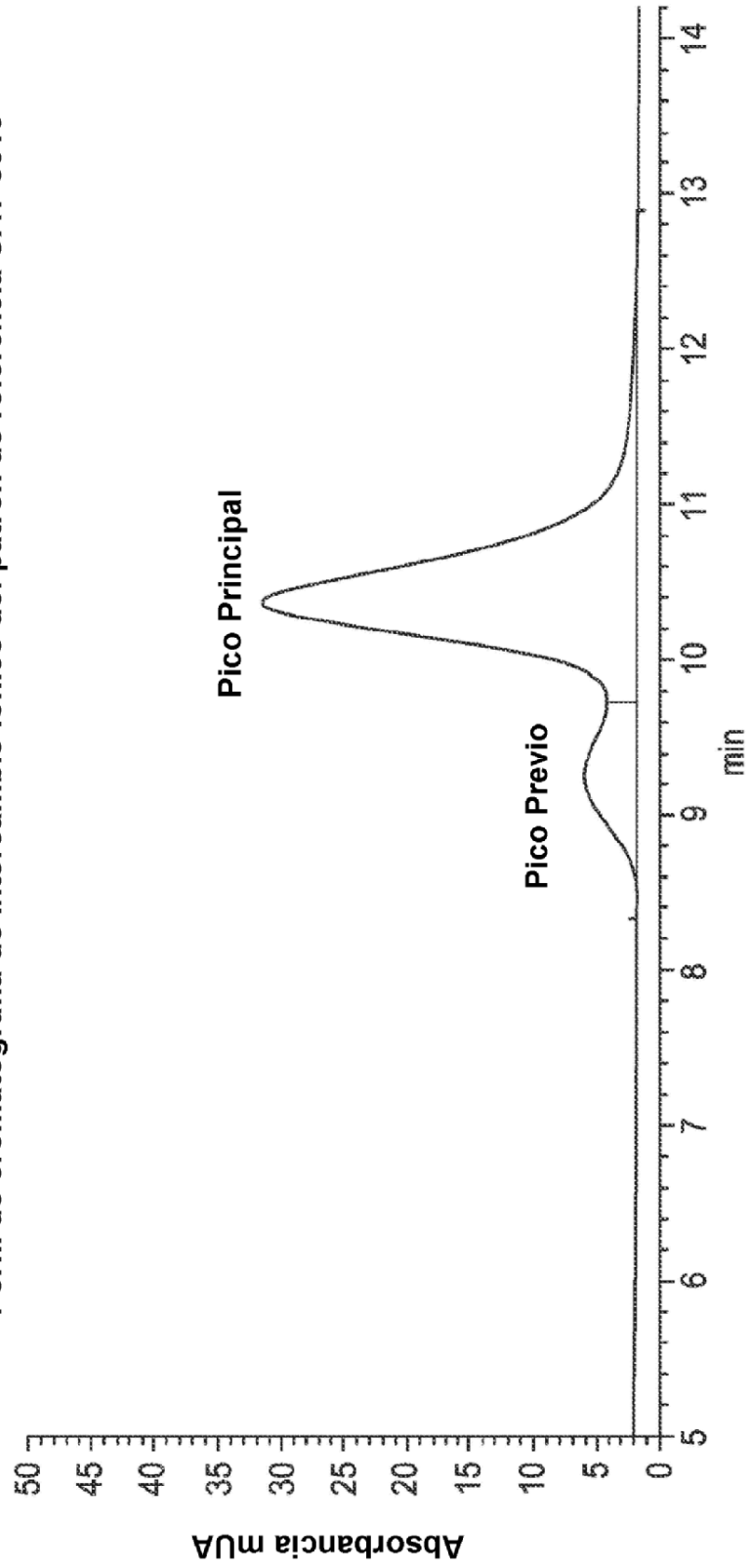
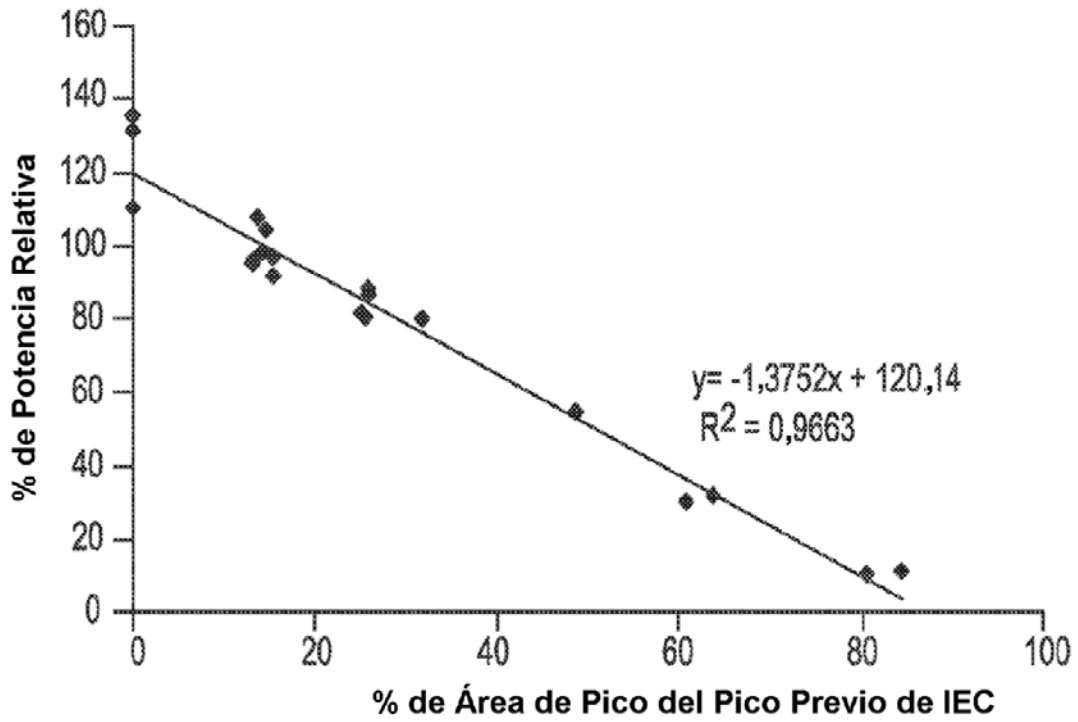


FIG. 2

Correlación entre el % de Potencia Relativa y el % de Pico Previo



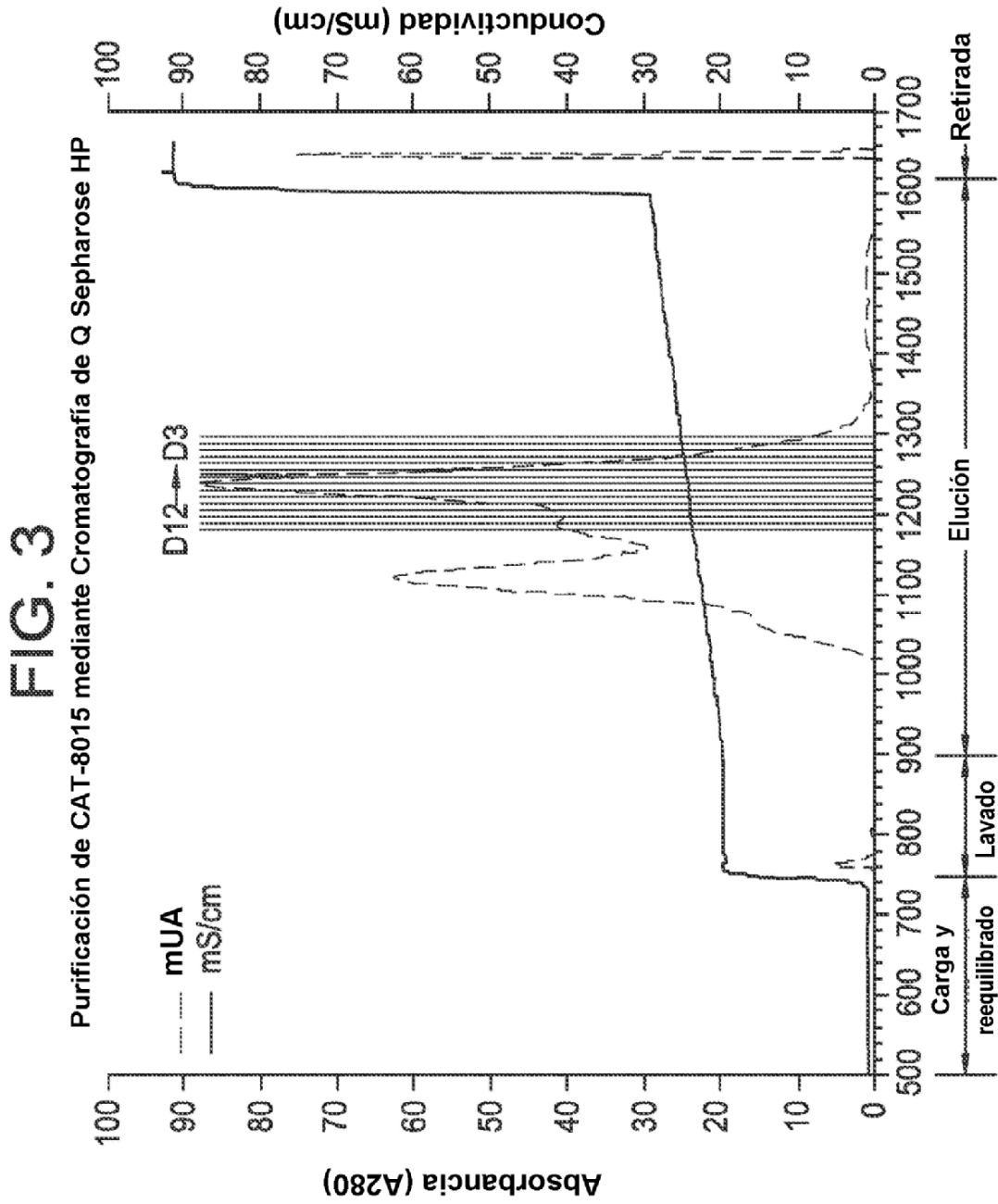


FIG. 4
Análisis por SDS-PAGE de
Muestras de Grupos de Carga
y Eluato de QHP

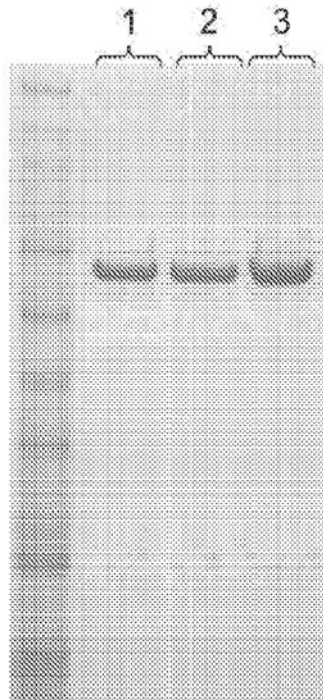


FIG. 5
Purificación a Gran Escala de CAT-8015 en QHP

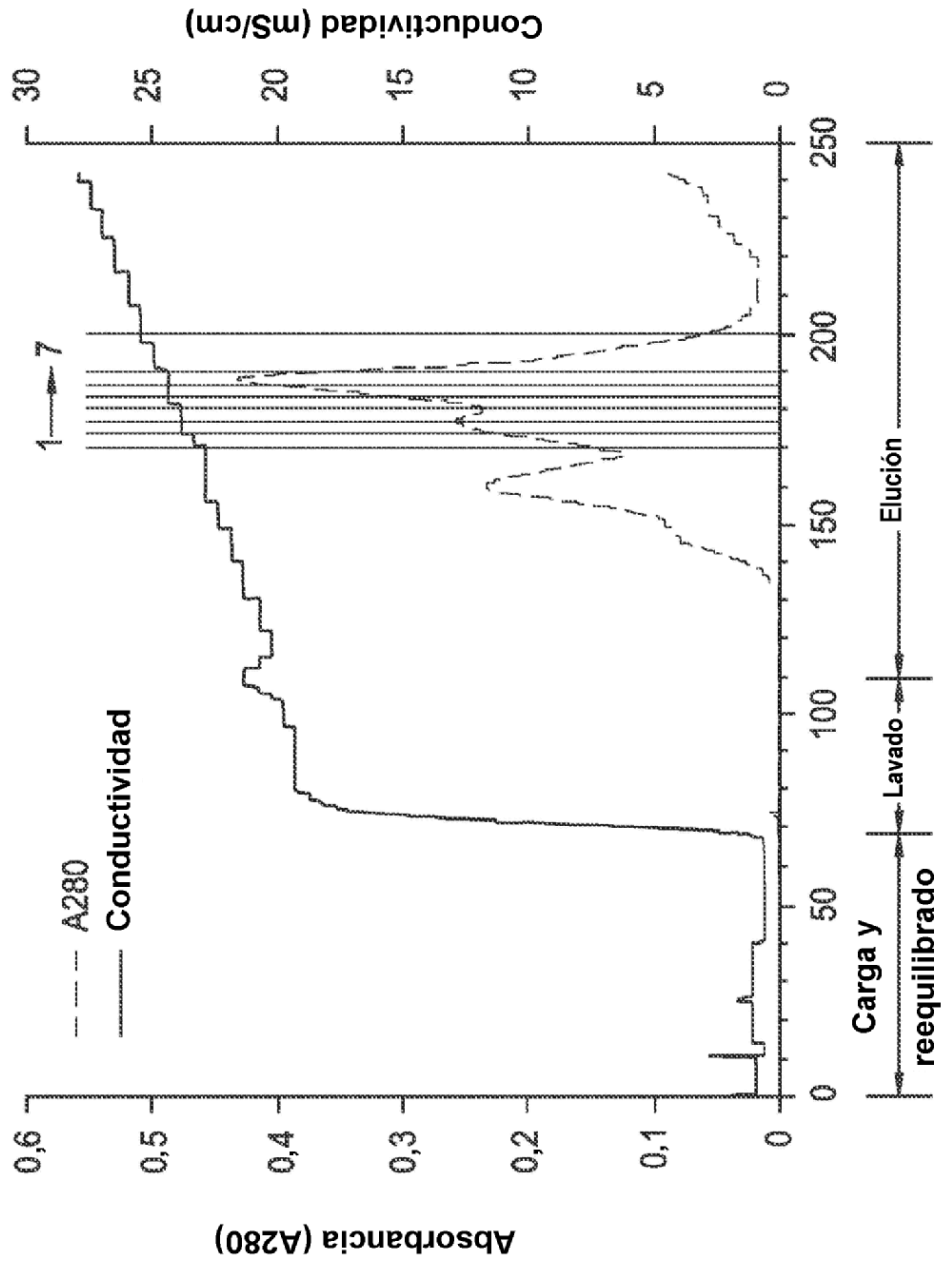


FIG. 6

Análisis por SDS-PAGE de Muestras de Grupos de Carga y Eluato de QHP

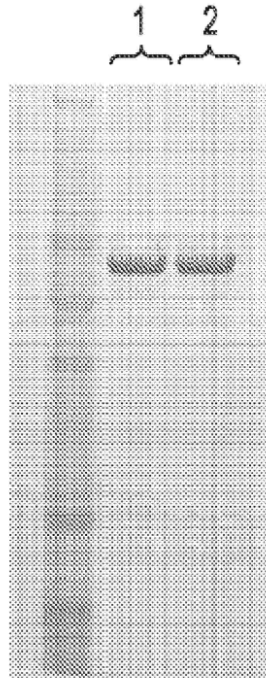


FIG. 7

Porcentaje de Pico Previo en el Producto de HA en Función del pH de Solubilización

