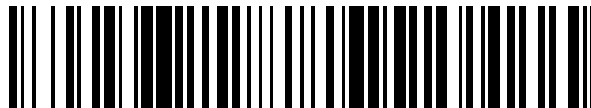


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 040**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2006 PCT/US2006/035025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2007 WO07035283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2006 E 06803196 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 1934242**

54 Título: **Floculación de proteínas mediante el uso de sales**

30 Prioridad:

15.09.2005 US 717838 P

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

13.03.2019

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**COFFMAN, JONATHAN L.;
SHPRITZER, RUSSELL I. y
VICIK, STEVEN M.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 704 040 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

Floculación de proteínas mediante el uso de sales

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/717,838, presentada el 15 de septiembre de 2005.

Campo técnico

La invención se refiere a procedimientos de separación, por ejemplo, procedimientos de recuperación de un producto purificado de un fluido que incluye impurezas tales como una o más impurezas solubles, células, residuos celulares o impurezas insolubles.

10 **Antecedentes**

En la industria de la biotecnología, la purificación de proteínas a escala comercial es un desafío importante para el desarrollo de proteínas recombinantes con fines terapéuticos y de diagnóstico. Los problemas relacionados con el rendimiento, la pureza y el rendimiento desafían al sector manufacturero. Con el advenimiento de la tecnología de proteínas recombinantes, se puede producir una proteína de interés usando líneas celulares huésped eucariotas cultivadas diseñadas para expresar un gen que codifica la proteína. Lo que puede resultar de un proceso de cultivo de la célula huésped, sin embargo, es una mezcla de la proteína deseada junto con las impurezas que se derivan de la proteína en sí, tal como las variantes de proteínas, o de la célula huésped, tal como las proteínas de la célula huésped, el ADN, y los residuos celulares. El uso de la proteína recombinante deseada para aplicaciones farmacéuticas puede depender de la capacidad de recuperar de manera confiable niveles apropiados de la proteína de estas impurezas. La tecnología recombinante también puede producir proteínas que no se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, nuevas proteínas mutantes, proteínas de fusión o proteínas con secuencias de señales heterólogas que dirigen la secreción de la proteína al medio. Las proteínas recombinantes se pueden expresar en muchos tipos de células eucariotas, incluidas las células de ovario de hámster chino (CHO), el riñón de hámster bebé (BHK), las células de mieloma NS0 y las células de levadura *Pichia pastoris*.

25 Por lo general, para producir una proteína recombinante, se crea un vector de ADN recombinante que contiene un gen que codifica la proteína que se va a expresar con secuencias apropiadas para dirigir la transcripción y traducción del gen en el tipo de célula deseado. El vector también puede contener secuencias tales como marcadores seleccionables o contraseleccionables, por ejemplo, genes de resistencia a fármacos, y/o secuencias diseñadas para promover la retención estable de las secuencias de expresión de proteínas. Para células de mamíferos, se pueden usar vectores de plásmidos y virus, por ejemplo, vectores retrovirales.

Después de la creación del vector, luego el vector se introduce en las células. El vector se puede transfectar como ADN desnudo usando procedimientos estándar, por ejemplo, lipofección, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación o biolística (pistola de genes). Los vectores virales se pueden introducir por infección con partículas virales. Luego las células se criban o seleccionan para aquellas que contienen el vector.

35 Las células que contienen el vector y expresan la proteína recombinante se pueden cultivar en un medio líquido o en un soporte sólido, y la proteína se puede aislar del cultivo celular. La densidad celular de los mamíferos varía entre 10^6 células/ml y 2×10^7 células por ml o más. La mayoría de las proteínas son secretadas. Las concentraciones de proteínas secretadas pueden oscilar entre 4mg/l y 10g/l. Sin embargo, si la proteína se produce intracelularmente, las células se rompen para liberar la proteína, mientras que si la proteína se secreta, se puede aislar del medio de crecimiento o el soporte después de la eliminación de las células y los residuos celulares. A continuación, la proteína aislada se puede purificar.

45 Los procedimientos convencionales de purificación de proteínas biofarmacéuticas usados para eliminar células y residuos celulares incluyen centrifugación, microfiltración y filtros de profundidad. Los auxiliares de filtración, tales como la tierra de diatomeas, se pueden usar para mejorar el rendimiento de estas etapas, pero no siempre son eficaces y, a veces, unen significativamente el producto de interés. Su uso también puede requerir la adición de una suspensión homogénea y sólida que puede ser un desafío como parte de las operaciones biofarmacéuticas a gran escala.

Los floculantes poliméricos se pueden usar para ayudar en la clarificación de las corrientes del proceso de cultivo de células de mamíferos, pero pueden tener limitaciones. Por ejemplo, las preparaciones de sulfato de protamina por lo general usadas como auxiliares de procesamiento tienen una aplicación limitada debido a las preocupaciones sobre la inactivación de la proteína de interés o la pérdida de producto debido a la precipitación (Scopes, 1987). Los reactivos de alta calidad, tales como los que se venden para uso médico, pueden ser costosos. En ciertos casos, la eliminación a niveles muy bajos puede requerir validación para garantizar que no haya efectos inesperados en los pacientes. Por ejemplo, el quitosano no es un reactivo bien definido y existe preocupación por su rendimiento constante en el uso rutinario en aplicaciones de clarificación. Los polímeros de carga múltiple, tales como dextrano

DEAE, los polímeros a base de acrilamida que se usan a menudo en el tratamiento de aguas residuales (NALCO Water Handbook, Capítulo 8) y la polietilenamina (PEI) se han considerado para uso en aplicaciones de clarificación. Con respecto a los dos últimos tipos de polímeros, los reactivos de acrilamida tienen el potencial de contaminación con reactivos tóxicos y polietilenamina, mientras que un reactivo de clarificación altamente eficaz, a menudo está contaminado con cantidades variables de monómero de etilenimina, un agente sospechoso de cáncer (Scawen et al.). Además, muchos de estos polímeros, incluido PEI, tienden a unirse de manera casi irreversible a muchas resinas de cromatografía, limitando así las opciones de procesamiento posteriores. Los asuntos regulatorios y de reutilización de la materia prima asociados con estos polímeros han limitado su aplicación principalmente a estudios académicos.

Los floculantes no basados en polímeros, tal como el alumbre y las sales de hierro, se han usado en la industria de tratamiento de aguas residuales (NALCO Water Handbook). Estas sustancias pueden parecer no ser útiles en el procesamiento de productos proteicos, ya que se pueden unir al producto proteico o pueden catalizar reacciones químicas que resultan en modificaciones de la proteína que podrían afectar la seguridad o la eficacia.

Bajpaj et al., "Clarification of bacterial broth containing high alpha-amylase activity" (Biotechnology Techniques, Chapman et Hall, vol. 4, N°4, 1990, pages 227-232, XP008008107 ISSN: 0951-208X) revelan agentes coagulantes-floculantes inorgánicos y orgánicos para la clarificación de caldo bacteriano.

El documento WO96/38469 revela un procedimiento para la purificación de una proteína obtenida a partir de una solución de proteína acuosa, usando un agente floculante.

Sumario

La invención se refiere a procedimientos de separación. Los procedimientos de separación se pueden usar para aislar una proteína, tal como una proteína recombinante, de un fluido que contiene impurezas, tal como una o más impurezas solubles, impurezas insolubles, células o residuos celulares.

En un aspecto, la invención presenta procedimientos de separación que incluyen la adición a un fluido de una o más (por ejemplo, dos o más) soluciones solubles que pueden formar un precipitado que ayuda en la eliminación de impurezas. El precipitado se puede asociar más fuertemente con impurezas y menos fuertemente a un producto diana. Las soluciones pueden incluir cationes solubles, por ejemplo, iones metálicos y/o aniones solubles que pueden interactuar con, por ejemplo, partículas, material coloidal, residuos celulares o células, y forman un precipitado insoluble, por ejemplo, cuando se mezclan entre sí. El precipitado resultante se puede aclarar o eliminar usando técnicas de separación sólido-líquido, tal como microfiltración, filtración profunda o centrifugación. El fluido tratado puede tener un nivel de impureza reducido en comparación con el fluido no tratado procesado de manera similar.

Las impurezas pueden estar relacionadas con aquellos elementos que se encuentran en suspensión dentro del fluido. En algunas realizaciones, las impurezas incluyen material coloidal, material particulado, células, residuos celulares tales como fragmentos de membrana y otros complejos celulares grandes que son insolubles en condiciones de procesamiento típicas. Las impurezas también se pueden referir a componentes celulares que permanecen solubles en las condiciones de procesamiento típicas. El ADN, las proteínas de la célula huésped y los fosfolípidos son ejemplos de componentes celulares que están presentes en la solución durante la clarificación. Además, pueden estar presentes impurezas relacionadas con productos solubles, tales como isoformas inactivas o especies añadidas.

Los niveles de impureza se pueden evaluar mediante una variedad de procedimientos. Un procedimiento, que proporciona una medida de la cantidad de residuos en el fluido, es la medición nefalométrica de la turbidez. Alternativamente, el nivel de residuos se puede evaluar midiendo el área del filtro de membrana requerido para procesar un volumen conocido del fluido. Las impurezas específicas también pueden ser solubles en el fluido que requiere pruebas bioquímicas específicas para evaluar. Los niveles de ADN se pueden medir usando procedimientos basados en fluorometría, tal como el uso del colorante Picogreen disponible comercialmente (Invitrogen, número de producto P-7581). Los enfoques alternativos incluyen procedimientos de hibridación, tales como técnicas de transferencia de ranura, o reacción en cadena de la polimerasa (procedimientos de PCR). Los niveles de proteína de la célula huésped se pueden evaluar mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (SDSPAGE), cromatografía de fase reversa o procedimientos de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los fosfolípidos se pueden analizar mediante cromatografía en capa fina o cromatografía líquida de alto rendimiento.

El precipitado resultante puede interactuar tanto con las impurezas en suspensión como con las impurezas solubles, y esta interacción puede disminuir los niveles de estas impurezas en el fluido purificado. Como resultado, los procedimientos de separación pueden proporcionar costos y/o ahorros de tiempo, así como una mayor calidad del producto, por ejemplo, para un proceso industrial que usa cultivos de células de mamíferos para la producción de proteínas recombinantes.

En otro aspecto, la invención presenta un aumento en el rendimiento de las etapas cromatográficas posteriores, por ejemplo, el rendimiento de una etapa cromatográfica de Proteína A. La cromatografía de proteína A se realiza por lo

- 5 general mediante la aplicación directa de un medio acondicionado libre de células a la resina en la que se ha inmovilizado la proteína A de *Staphylococcus aureus*. La resina se lava posteriormente con una solución acuosa de pH neutro (aproximadamente pH 6-8) y la proteína unida a menudo se eluye con una solución reguladora ácida. Antes del procesamiento posterior, el grupo de eluato se ajusta a pH neutro. El grupo de eluato de proteína A a menudo precipita después de la neutralización, especialmente cuando se usan cultivos celulares de alta densidad para la carga. De acuerdo con la invención, la eliminación de la proteína de la célula huésped mediante la etapa de la Proteína A es mayor cuando la carga se ha tratado con un metal y un anión en comparación con un fluido no tratado. En realizaciones, la precipitación del máximo de Proteína A tras la neutralización es a menudo menor cuando el fluido de carga se ha tratado con un catión y un anión que proporcionan una mejora de procesamiento.
- 10 En otro aspecto, la invención presenta la selección de dos agentes solubles que, cuando se mezclan, forman un sólido que puede mejorar la pureza del fluido del proceso con una alta recuperación del producto en condiciones apropiadas. Estos agentes pueden incluir calcio, manganeso, magnesio, aluminio, cobalto, níquel, carbonato, fluoruro, sulfito, fosfato, silicato y alginatos. Estos compuestos representan una combinación de iones metálicos multivalentes, con aniones monovalentes, o alternativamente, aniones multivalentes o polivalentes, que son los ligandos preferidos del metal. Las sales de estos cationes y aniones, cuando se mezclan en condiciones apropiadas potencialmente para formar complejos que son poco solubles, pueden tener utilidad en aplicaciones de clarificación.
- 15 En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento, que incluye la formación de un sólido que tiene un primer catión y un primer anión en un medio que incluye una proteína; y separación del sólido de la proteína.
- 20 En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento, que incluye la introducción de un primer catión y un primer anión en un medio que tiene una proteína; precipitación de un sólido que tiene el primer catión y el primer anión; y separación del sólido de la proteína.
- 25 Los procedimientos descritos en este documento se pueden usar para facilitar la filtración de una o más impurezas de un medio, por ejemplo, un medio de fluido (por ejemplo, una suspensión turbia). Por ejemplo, estos procedimientos se pueden usar en un medio que tiene uno o más agentes que causan turbidez que hacen que las impurezas sean difíciles o inconvenientes de eliminar usando procedimientos de filtración convencionales. De este modo, en otro aspecto, la invención presenta un procedimiento que incluye (i) formación de un sólido que incluye un primer catión y un primer anión en un medio (por ejemplo, un medio de fluido) que incluye una unidad estructural diana (por ejemplo, una unidad estructural a ser purificado) y uno o más agentes que causan turbidez, tales como proteínas de la célula huésped precipitadas o añadidas, lípidos, residuos celulares, células completas, ADN precipitado o el precipitado que se forma al neutralizar el pico de la Proteína A y (ii) separación del sólido y el (los) agente (s) causantes de la turbidez a partir de la solución mediante, por ejemplo, filtración. En realizaciones, el agente causante de la turbidez puede ser de origen no celular, tal como material coloidal, material particulado derivado de fuentes ambientales tales como arena, suciedad, finos de acero inoxidable molido, o excipientes precipitados tales como antiespumante o urea. El medio (por ejemplo, una suspensión turbia) puede tener una turbidez relativamente alta, tal como mayor que 5NTU según lo medido por un medidor de turbidez, o mayor que 100NTU, o mayor que 500NTU. En algunas realizaciones, la presencia del sólido puede aumentar la capacidad de filtro del medio. En algunas realizaciones, la turbidez del medio tratado (por ejemplo, el medio después de realizar las etapas (i) y (ii)) puede ser menor que el medio no tratado. En algunas realizaciones, la unidad estructural diana puede ser una proteína (por ejemplo, una proteína soluble, por ejemplo, un anticuerpo). El procedimiento puede incluir además la recuperación de la unidad estructural diana de la solución después de la filtración.
- 30 35 40 Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.
- El primer catión puede ser calcio, magnesio, estroncio, aluminio, escandio, lantano, silicio, titanio, circonio, torio, manganeso, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, zinc o vanadio. El primer catión puede ser calcio.
- 45 El primer anión puede ser fosfato, carbonato, cromato, tungstato, hidróxido, haluro, succinato, tartrato, citrato, sulfito, molibdato, nitrato, fluoruro, silicato y alginato. El primer anión puede ser fosfato.
- El primer catión puede ser calcio y el primer anión puede ser fosfato.
- El sólido puede tener una constante del producto de solubilidad de no más de $10^{-4}M^2$.
- El procedimiento puede incluir además la introducción desde 4 mM a 200 mM del primer catión o el primer anión en el medio.
- 50 El producto de las concentraciones del primer catión y el primer anión puede ser mayor que $10^{-5}M^2$, $10^{-4}M^2$ o $2,7 \times 10^{-2}M^2$.
- Las concentraciones del primer catión y el primer anión en el medio pueden ser diferentes.
- Las concentraciones del primer catión y el primer anión en el medio pueden ser sustancialmente las mismas.
- El procedimiento puede incluir además cambiar el pH del medio.

El pH del medio se puede mantener entre 5 y 9.

El procedimiento puede proporcionar la separación de al menos el 50 % de la proteína en el medio. El procedimiento puede proporcionar una separación de al menos el 70 % de la proteína en el medio.

5 El procedimiento puede incluir además disminuir la turbidez clarificada del medio clarificado en al menos un 30 % con respecto a un segundo medio clarificado idéntico al medio y libre del sólido. El procedimiento puede incluir además disminuir la turbidez del medio clarificado en al menos un 50 % con respecto a un segundo medio clarificado idéntico al medio y libre del sólido.

El medio puede incluir células. El medio puede incluir además células de mamífero. El medio puede incluir además células eucariotas.

10 El procedimiento puede incluir además centrifugar el medio, filtrar el medio a través de una membrana de microfiltración, o filtrar el medio a través de un filtro de profundidad.

El sólido puede incluir además una segunda especie de catión o un segundo anión.

15 El medio que incluye la proteína, después de que se forme y se separe el sólido, se puede aplicar a una columna de Proteína A y se eluye para proporcionar un pico eluido que tiene una turbidez más baja que un pico eluido de un segundo medio idéntico al primer medio y libre de formación del sólido

El medio que incluye la proteína, después de que se forme y se separe el sólido, se puede aplicar a una columna de Proteína A y se eluye para proporcionar un pico eluido que tiene un nivel de impureza soluble más bajo que un pico eluido de un segundo medio idéntico al medio y libre de formación del sólido.

El primer catión y el primer anión se pueden introducir secuencialmente.

20 El primer catión y el primer anión se pueden introducir simultáneamente.

El procedimiento puede incluir la introducción de diferentes concentraciones del primer catión y el primer anión en el medio o la introducción de la misma concentración del primer catión y el primer anión en el medio.

El procedimiento puede incluir además ajuste de la temperatura del medio.

25 La proteína puede ser una proteína secretada. La proteína puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un receptor soluble, una fusión de receptores, una citoquina, un factor de crecimiento, una enzima o un factor de coagulación.

30 En realizaciones en las que la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo, puede incluir al menos una, y por lo general dos cadenas pesadas de longitud completa, y/o al menos una, y por lo general dos cadenas ligeras. Alternativamente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden incluir solo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento de cadena única Fv). El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal o de especificidad única. El anticuerpo o fragmento del mismo también puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico, injertado con CDR o generado in vitro. En otras realizaciones más, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera elegida de, por ejemplo, kappa o lambda. En una realización, la región constante se altera, por ejemplo, se muta, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: la unión al receptor Fc, la glicosilación del anticuerpo, el número de residuos de cisteína, la función de las células efectoras, o función del complemento). Por lo general, el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un antígeno predeterminado, por ejemplo, un antígeno asociado con un trastorno, por ejemplo, un trastorno neurodegenerativo, metabólico, inflamatorio, autoinmune y/o maligno. Los anticuerpos de ejemplo que se pueden separar por los procedimientos de la invención incluyen anticuerpos contra un péptido Aβ, interleuquina-13 (IL-13), interleuquina-22 (IL-22), 5T4, y factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF)-8).

Otros aspectos, características y ventajas serán evidentes a partir de la descripción de las implementaciones preferidas de los mismos y de las reivindicaciones.

45 Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo de una realización de un procedimiento de separación.

La figura 2 es una representación gráfica que muestra el efecto de la escala y el procedimiento de mezcla en la floculación.

La figura 3 es una representación gráfica que muestra el efecto de la velocidad de mezcla en la floculación.

50 La figura 4 es un resumen gráfico de cinco experimentos de floculación a escala piloto.

La figura 5 es un resumen gráfico que muestra los cambios en el % de recuperación de anticuerpos a lo largo del tiempo para cada uno de los cinco experimentos de floculación a escala piloto resumidos en la figura 4.

Descripción detallada

5 Con referencia a la figura 1, se muestra un procedimiento 30 para separar una proteína dirigida, tal como una proteína recombinante. El procedimiento 30 incluye añadir sales solubles (tal como una sal que contiene calcio y una sal que contiene fosfato) a un fluido que contiene la proteína (etapa 32), e impurezas (que pueden incluir residuos celulares, células, ADN, proteína de la célula huésped, e impurezas relacionadas con el producto, como isoformas inactivas o especies añadidas). Las soluciones salinas pueden contener agentes reguladores para minimizar los cambios de pH o para optimizar el pH en el fluido al mezclar las soluciones salinas. Tras el contacto (por ejemplo, la mezcla), las sales solubles a menudo comienzan a reaccionar para formar un precipitado insoluble (tal como el fosfato de calcio sólido) que se puede sedimentar en el medio. Como se muestra en la figura 1, el medio puede ser titulado posteriormente a un pH predeterminado y la temperatura se ajusta (etapa 34), según sea necesario, para mejorar la precipitación. El precipitado de sedimentación también sedimenta las células y los residuos, y potencialmente otras impurezas, mientras que la proteína diana permanece esencialmente soluble en el fluido. La suspensión de fluidos se incuba bajo condiciones apropiadas por una duración determinada para promover la precipitación y optimizar la clarificación mientras se mantienen altos niveles de recuperación de proteínas diana (Etapa 36). Posteriormente, el precipitado se separa del fluido que contiene la proteína diana (etapa 38). Esta operación se puede realizar de varias formas, incluida la sedimentación por gravedad, la centrifugación o la filtración, en el que las alternativas de filtración incluyen la filtración por flujo tangencial, la filtración profunda, la filtración a través de medios cargados, la filtración por almohadilla donde la tierra de diatomeas es un componente de los medios. La cantidad de catión y anión añadidos al medio puede no ser suficiente para permitir la sedimentación por gravedad de la precipitación o de los residuos, pero aún puede facilitar la filtración actuando como un auxiliar de filtro. La separación sólido-líquido puede incluir el procesamiento mediante una serie de las opciones antes mencionadas, que por lo general culminan con el paso del fluido a través de un filtro con una calificación nominal de poro nominal baja (tal como 0,45, 0,2 o 0,1 μM), que se puede considerar esterilizante en el grado. El fluido clarificado por los procedimientos de floculación descritos en este documento puede requerir menos área de filtración, ya sea como parte de la clarificación primaria o después de una etapa inicial de separación sólido-líquido tal como la centrifugación. Además, la turbidez de postalmohadilla y del filtro de grado postesterilización se puede reducir significativamente en comparación con un control no floculado.

30 Por lo general, la purificación posterior puede proceder a través de una serie de etapas cromatográficas, aunque se pueden concebir otros procedimientos de purificación, tales como la cristalización y la precipitación. Después de la clarificación usando el procedimiento descrito, el rendimiento de la primera etapa cromatográfica, que para los anticuerpos es a menudo una columna de Proteína A, puede mejorarse. La eliminación total de las impurezas derivadas de la célula huésped, incluida la proteína de la célula huésped, puede ser mayor que cuando no se realiza el tratamiento de floculación. En muchos casos, el pico de la mezcla de eluato de proteína A neutralizada también tiene menos precipitación en comparación con el control no tratado. Esta disminución del nivel de precipitación puede requerir menos área de filtro o puede reducir el tiempo de procesamiento necesario. La disminución del nivel de precipitación también indica la eliminación de una impureza no deseada.

40 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el precipitado insoluble mejora la separación de la proteína al asociarse selectivamente con las células, los residuos celulares y otras impurezas de la corriente del proceso, mientras que no interactúa significativamente con la proteína. Un ejemplo del proceso hipotético de eliminación de impurezas se muestra en la ecuación (1) a continuación:



45 Con referencia a la ecuación (1), M^+ es un catión soluble [esto es, "(s)"] y A^- es un anión soluble que puede interactuar con M^+ para formar una sal o complejo insoluble; los círculos sombreados y rellenos representan cada uno una impureza soluble o insoluble; **1** es un precipitado insoluble que incluye la sal o complejo catión-anión e impurezas asociadas con el mismo (**1** a veces se denomina en este documento como "complejo o sal final" o "sólido que tiene un primer catión y un primer anión"); y la flecha que apunta hacia abajo indica que **1** está en forma precipitada. Por ejemplo, el fosfato de calcio puede interactuar iónicamente y/o por quelación con el ADN, la proteína de la célula huésped y los residuos celulares, mientras que no interactúa significativamente con la proteína diana. Esta selectividad permite que la proteína permanezca en el sobrenadante y, posteriormente, se separe fácilmente del medio y otros componentes del medio acondicionado.

Todavía en referencia a la figura 1, el procedimiento de separación 30 incluye la introducción de una primera sal soluble y una segunda sal soluble en un medio (etapa 32). El medio puede ser, por ejemplo, una solución acuosa acondicionada en la que se ha formado una proteína recombinante. La primera sal soluble incluye un primer catión, y la segunda sal soluble incluye un primer anión. Al contacto, el primer catión y el primer anión son capaces de interactuar en el medio y pueden comenzar a formar un precipitado insoluble. El ambiente del fluido se puede ajustar en cualquier momento en pH o temperatura para optimizar las condiciones de precipitación (por ejemplo, la etapa 34) y la solución se incuba durante un tiempo determinado para permitir que el sistema se equilibre completamente (etapa 36).

En general, se puede seleccionar cualquier combinación de catión (por ejemplo, un primer catión)/anión (por ejemplo, un primer anión) que sea capaz de formar una sal o complejo relativamente insoluble en el fluido que contiene el producto de interés. En realizaciones, tales sales o complejos se pueden identificar como insolubles, escasamente solubles, prácticamente insolubles, muy poco solubles o ligeramente solubles en una solución comparable al fluido que contiene el producto de interés. Las combinaciones de ejemplo de catión/anión incluyen aquellas en las que el catión (por ejemplo, un primer catión, por ejemplo, M^+ en la ecuación 2 a continuación) y el anión seleccionado (por ejemplo, un primer anión, por ejemplo, A^- en la ecuación 2 a continuación) son capaces de formar una sal o complejo (por ejemplo, MA en la ecuación 2 a continuación) que es relativamente insoluble en agua:



en la que "(s)" y la flecha que apunta hacia abajo son las definidas con respecto a la ecuación (1). En muchos casos, la caracterización de la solubilidad en agua como se describe en *The Merck Index* o the *Handbook of Physics and Chemistry* u otras referencias similares sirve como un indicador apropiado de rendimiento potencial.

En algunas realizaciones, el catión seleccionado y el anión seleccionado son capaces de formar una sal o complejo que tiene una constante de producto de solubilidad (K_{sp}) en agua de $1 \times 10^{-4} M^2$ a $1 \times 10^{-50} M^2$ (por ejemplo, de $1 \times 10^{-5} M^2$ a $1 \times 10^{-50} M^2$, de $1 \times 10^{-6} M^2$ a $1 \times 10^{-50} M^2$, de $1 \times 10^{-4} M^2$ a $1 \times 10^{-40} M^2$). En algunas realizaciones, los cationes y aniones de ejemplo se pueden identificar como una constante de producto de solubilidad (K_{sp}) entre el primer catión y el primer anión ([catión] x [anión]) de menos de $10^{-4} M^2$, por ejemplo, y preferiblemente por debajo de $10^{-5} M^2$ o $10^{-6} M^2$. Se pueden usar sustancias con valores de K_{sp} inferiores a $10^{-4} M^2$ en los procedimientos, ya que estas sustancias, al mezclar el catión y el anión, pueden dar como resultado una solución final de como máximo 10 mM de cada uno; la adición del catión o anión en exceso de 10 mM puede resultar en precipitación y posterior floculación. Se pueden usar sustancias con valores de K_{sp} más altos que los enumerados anteriormente, sin embargo, se puede necesitar una cantidad excesiva de catión y anión para formar el sólido.

El catión (por ejemplo, un primer catión) puede ser un metal alcalinotérreo, un metal de transición o un elemento del grupo principal. Estos elementos se pueden clasificar en ácidos duros, ácidos límite o ácidos blandos. Ejemplos de primeros cationes incluyen calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), estroncio (Sr^{2+}), aluminio (Al^{3+}), cobre ($Cu(I)$ o $Cu(II)$), escandio (Sc^{+3}), lantano (La^{+3}), silicio (Si^{4+}), titanio ($Ti(III)$ o $Ti(IV)$), torio, circonio, manganeso ($Mn(II)$ o $Mn(III)$), cobalto ($Co(II)$ o $Co(III)$), cromo ($Cr(II)$ o $Cr(III)$), hierro ($Fe(II)$ o $Fe(III)$), níquel (Ni^{2+}) y vanadio ($V(III)$, $V(IV)$, o $V(V)$). Estos representan los ácidos duros y límites. El primer anión puede ser una especie atómica o una especie molecular. En algunas realizaciones, el primer catión puede ser Ca^{2+} , Mg^{2+} , $Mn(II)$, $Co(II)$ o Ni^{2+} . En ciertas realizaciones, el primer catión puede ser Ca^{2+} .

Los ejemplos de los primeros aniones incluyen aniones que son los ligandos preferidos del ion metálico usado. Para el ácido duro y los ácidos límite, los aniones pueden incluir fluoruro, fosfato, carbonato, silicato, cromato, tungstato, hidróxido, sulfito, nitrato, molibdato, succinato, tartrato y citrato, y hasta cierto punto sulfatos y percloratos (véase *Aquatic Chemistry*, Editors W. Stumm and JS Morgan, J Wiley, (1981), p 343; y R.G. Pearson, *J. Amer. Chem. Soc.*, v 85, p 3533 (1963)). En algunas realizaciones, el primer anión puede ser fosfato, sulfito, carbonato, fluoruro, molibdato o silicato. En ciertas realizaciones, el primer anión puede ser fosfato.

En algunas realizaciones, el primer catión puede ser Ca^{2+} , y el primer anión puede ser fosfato, sulfito, carbonato, fluoruro, molibdato o silicato. En ciertas realizaciones, el primer catión puede ser Ca^{2+} , y el primer anión puede ser fosfato.

En algunas realizaciones, el primer catión puede ser Mg^{2+} , $Mn(II)$, $Co(II)$ o Ni^{2+} , y el primer anión puede ser fosfato, carbonato o fluoruro.

La concentración inicial para cada uno del primer catión y el primer anión (esto es, la concentración del primer catión y el primer anión que se introduce en el medio (antes del comienzo de la precipitación)) puede variar desde 2 milimolar a 200 milimolar (por ejemplo, desde 3 milimolar a 200 milimolar, desde 4 milimolar a 200 milimolar, desde 5 milimolar a 200 milimolar, desde 4 milimolar a 100 milimolar, desde 4 milimolar a 50 milimolar, desde 4 milimolar a

40 milimolar, desde 4 milimolar a 30 milimolar, desde 4 milimolar a 10 milimolar, desde 10 milimolar a 80 milimolar, desde 10 milimolar a 40 milimolar, desde 10 milimolar a 30 milimolar, desde 20 milimolar a 80 milimolar, desde 20 milimolar a 40 milimolar, por ejemplo, 4 milimolar, 6 milimolar, 10 milimolar, 13,3 milimolar, 16 milimolar, 20 milimolar, 24 milimolar, 30 milimolar, 33,3 milimolar, 40 milimolar, 50 milimolar, o 80 milimolar), dependiendo de la solubilidad del complejo final. En ciertas realizaciones, la concentración del primer catión introducido en el medio (antes del comienzo de la precipitación) puede ser 6 milimolar, 10 milimolar, 20 milimolar, 24 milimolar, 30 milimolar, 40 milimolar, 50 milimolar, o 80 milimolar. En ciertas realizaciones, la concentración del primer anión introducido en el medio (antes del inicio de la precipitación) puede ser milimolar, 10 milimolar, 13,3 milimolar, 16 milimolar, 20 milimolar, 24 milimolar, 30 milimolar, 40 milimolar, 50 milimolar, o 80 milimolar. Por ejemplo, la concentración del primer catión introducido en el medio (antes del comienzo de la precipitación) puede ser de 30 milimolar, y la concentración del primer anión introducido en el medio (antes del comienzo de la precipitación) puede ser de 20 milimolar. Como otro ejemplo, la concentración del primer catión introducido en el medio (antes del comienzo de la precipitación) puede ser de 24 milimolar, y la concentración del primer anión introducido en el medio (antes del comienzo de la precipitación) puede ser de 16 milimolar.

En algunas realizaciones, el producto de las concentraciones iniciales descritas anteriormente del primer catión y el primer anión puede ser desde $4 \times 10^{-6} \text{ M}^2$ a $4 \times 10^{-2} \text{ M}^2$ (por ejemplo, desde $1,6 \times 10^{-5} \text{ M}^2$ a $4 \times 10^{-2} \text{ M}^2$, desde $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}^2$ a $4 \times 10^{-2} \text{ M}^2$, desde $1,6 \times 10^{-5} \text{ M}^2$ a $6,4 \times 10^{-3} \text{ M}^2$, o desde $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}^2$ a $6,4 \times 10^{-3} \text{ M}^2$). En algunas realizaciones, el producto de las concentraciones iniciales descritas anteriormente del primer catión y el primer anión puede ser mayor que $1 \times 10^{-5} \text{ M}^2$, mayor que $2 \times 10^{-5} \text{ M}^2$, mayor que $1 \times 10^{-4} \text{ M}^2$, mayor que $2 \times 10^{-4} \text{ M}^2$, mayor que $10 \times 10^{-4} \text{ M}^2$, o mayor que $2,7 \times 10^{-2} \text{ M}^2$. En algunas realizaciones, estas concentraciones pueden dar como resultado una precipitación significativa de la sal insoluble junto con las impurezas. Las concentraciones que son demasiado altas pueden generar un volumen sólido mayor que 10 % del volumen total del fluido. Las concentraciones en exceso de catión o anión 500 mM con constantes de baja solubilidad pueden dar un gran volumen de sólidos. La recuperación apropiada del producto desde un gran volumen sólido puede ser difícil usando técnicas estándar de separación sólido-líquido. Los ejemplos de precipitados incluyen fosfato de calcio, sulfato de calcio, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, silicato de calcio, molibdato de calcio, carbonato de magnesio, fosfato de magnesio, fluoruro de magnesio, fosfato de manganeso, carbonato de manganeso, fosfato de cobalto, fosfato de níquel y carbonato de níquel.

En algunas realizaciones, la K_{sp} de la sal o el complejo final en el medio de fluido (por ejemplo, 1 en la ecuación (1), esto es, el precipitado insoluble que incluye la sal o complejo catiónico-aniónico y las impurezas asociadas con el mismo) puede ser desde $1 \times 10^{-4} \text{ M}^2$ a $1 \times 10^{-50} \text{ M}^2$ (por ejemplo, desde $1 \times 10^{-5} \text{ M}^2$ a $1 \times 10^{-50} \text{ M}^2$, desde $1 \times 10^{-6} \text{ M}^2$ a $1 \times 10^{-50} \text{ M}^2$, desde $1 \times 10^{-4} \text{ M}^2$ a $1 \times 10^{-40} \text{ M}^2$). En algunas realizaciones, la K_{sp} de la sal o complejo final en el medio de fluido puede ser menor que 10^{-4} M^2 , por ejemplo, y preferiblemente menor que 10^{-5} M^2 o 10^{-6} M^2 . Por ejemplo, en la muestra anti-IL13 # 2 con calcio 40 mM y fosfato 20 mM en la tabla 1, el sobrenadante después de la centrifugación (esto es, después de la precipitación) contenía calcio 8,19 mM y fosfato 1,04 mM. Este nivel de calcio y fosfato solubles corresponde a una K_{sp} de $8,5 \times 10^{-6} \text{ M}^2$. En la muestra anti-AB #1 con calcio 80 mM y fosfato 20 mM en la tabla 1, el sobrenadante después de la centrifugación contenía calcio 22,2 mM y fosfato 0,4 mM. Este nivel de calcio y fosfato solubles corresponde a una K_{sp} de $8,4 \times 10^{-6} \text{ M}^2$.

En algunas realizaciones, la K_{sp} de la sal o complejo final en los medios de fluidos (por ejemplo, 1 en la ecuación (1)) puede ser diferente (por ejemplo, mayor que) la K_{sp} de la sal o complejo catiónico-aniónico propio (esto es, no hay impurezas asociadas, por ejemplo, 2 en la ecuación (2)) en el agua. Por ejemplo, al referirse a las ecuaciones (1) y (2), la K_{sp} de, por ejemplo, 1 (por ejemplo, MA = fosfato de calcio) en el fluido puede ser diferente desde (por ejemplo, mayor que) la K_{sp} de fosfato de calcio por sí mismo en el agua. (por ejemplo, 2 en la ecuación (2) en la que MA = fosfato de calcio).

Se pueden realizar otras implementaciones de formación del precipitado. Por ejemplo, el primer catión y el primer anión se pueden introducir en el medio de manera sustancialmente simultánea o secuencialmente. En implementaciones en las que el primer catión es calcio y el primer anión es sulfato, la introducción del sulfato en el medio antes de introducir el calcio en el medio puede aumentar la precipitación de impurezas (Ejemplo 2). Las concentraciones del primer catión y el primer anión pueden ser sustancialmente iguales o diferentes (ricas en cationes o ricas en aniones). Por ejemplo, la concentración de un ion puede ser 1,5 veces, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces mayor que la concentración del otro ion. En algunas implementaciones, se introducen más de un catión y/o más de un anión en el medio. La concentración total de los cationes puede variar desde 5 milimolar a 200 milimolar, al igual que la concentración total de los aniones. Cuando se usan soluciones poliméricas, la concentración, en mM, puede ser sustancialmente menor en función del peso molecular del polímero; la concentración puede depender del peso molecular del monómero. En otras implementaciones, solo uno o más cationes o solo uno o más aniones se introducen en el medio. Por ejemplo, cuando el medio que contiene la proteína ya incluye aniones o cationes capaces de formar un precipitado, entonces se pueden añadir los cationes o aniones apropiados, respectivamente, para formar el precipitado. Alternativamente, se pueden añadir iones para reaccionar con los iones que ya están en el medio para formar un primer precipitado, y se pueden añadir combinaciones de catión/anión adicionales en el medio para formar otros precipitados.

Como se muestra en la figura 1, los procedimientos pueden incluir opcionalmente titulación del medio a un pH apropiado y/o ajuste de la temperatura (etapa 34).

En algunas realizaciones, el pH del medio se puede ajustar a un pH predeterminado para aumentar la precipitación (etapa 34). El pH del medio se puede aumentar o disminuir, por ejemplo, mediante titulación con una base (por ejemplo, NaOH) o un ácido, como el ácido fosfórico o el ácido clorhídrico. El pH predeterminado puede ser una función de, por ejemplo, el o los catión (es) y anión (es) en el medio, otros materiales en el medio y/o la composición del medio. El pH predeterminado puede variar de cinco a nueve, por ejemplo, desde 6,5 a 9.

En otras realizaciones, el pH del medio no se ajusta.

En algunas realizaciones, el medio puede calentarse o enfriarse para optimizar el rendimiento (etapa 34). Al igual que con el ajuste del pH, la temperatura y el tiempo durante el cual el medio se calienta o se incuba puede ser una función de, por ejemplo, el o los catión (es) y anión (es) en el medio, otros materiales en el medio y/o la composición del medio.

El medio se puede incubar a temperatura ambiente o calentarse, por ejemplo, a 37 °C. El período de incubación o calentamiento (etapa 36) puede variar de una hora a doce horas. Mientras el medio se incuba o se calienta, el medio se puede mezclar (por ejemplo, a bajas velocidades para reducir el cizallamiento de los materiales), o el medio se puede mezclar durante un período de tiempo inicial y dejar reposar sin mezclar para que el precipitado se sedimente, que permite separar fácilmente el sobrenadante que contiene proteínas.

En otras realizaciones, el medio no se calienta, por ejemplo, si la precipitación es suficiente para proporcionar una buena separación.

A continuación, el medio se centrifuga (etapa 38) para ayudar a separar el precipitado del sobrenadante, lo que reduce la turbidez del sobrenadante. Son posibles otros procedimientos de eliminación de sólidos, tales como la filtración profunda o la microfiltración. Como se ilustra a continuación en los ejemplos, la turbidez del se puede reducir en al menos un 30 % con respecto a una solución de control no tratada en la que no se produjo floculación. En algunas implementaciones, la turbidez del medio se reduce en al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % o más. Como se usa en este documento, la turbidez se mide usando un nefalómetro (tal como los fabricados por HACH, Loveland, CO) según los procedimientos estándar.

Después de la clarificación primaria, tal como a través de la centrifugación, se puede llevar a cabo una eliminación adicional de los residuos mediante el uso de la filtración (etapa 38). Como se ilustra a continuación en los ejemplos, los procedimientos de separación descritos en este documento pueden proporcionar altos rendimientos, con una recuperación de proteínas de al menos el 50 % (tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %). Como se usa en este documento, la recuperación se calcula como la masa de la proteína diana en la mezcla postratada a la masa en la mezcla de pretratamiento. La masa del producto es el producto de la concentración y volumen de proteína diana, donde la concentración se puede determinar mediante una variedad de procedimientos, tal como los ensayos de cromatografía líquida de alto rendimiento. Para proteínas diana que son anticuerpos, la concentración a menudo se puede determinar usando procedimientos de análisis basados en la proteína A. Los expertos en el arte del cultivo celular biofarmacéutico, la purificación o las metodologías de caracterización de proteínas pueden identificar procedimientos de ensayo apropiados.

La proteína se puede purificar posteriormente, según procedimientos convencionales.

Proteínas o polipéptidos

La presente invención se refiere a la separación de proteínas, por ejemplo, proteínas solubles o secretadas, a partir de un fluido. El término "proteína" como se usa en este documento se refiere a uno o más polipéptidos que pueden funcionar como una unidad. El término "polipéptido", como se usa en este documento, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término "polipéptido" se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en el arte entenderá que el término no se limita a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos entre sí. Si un solo polipéptido puede funcionar como una unidad, los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente.

En ciertas realizaciones, las proteínas se producen de forma recombinante. Los términos "proteína expresada de forma recombinante" y "proteína recombinante" como se usan en este documento se refieren a un polipéptido expresado a partir de una célula huésped que ha sido manipulada por la mano del hombre para expresar ese polipéptido. En ciertas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, esta manipulación puede comprender una o más modificaciones genéticas. Por ejemplo, las células huésped se pueden modificar genéticamente mediante la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican el polipéptido que se va a expresar. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante puede ser idéntico o similar a los polipéptidos que normalmente se expresan en la célula huésped. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante también puede ser extraño a la célula huésped, por ejemplo, heterólogo a los polipéptidos normalmente expresados en la célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante es quimérico. Por ejemplo, porciones de un polipéptido pueden contener secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a los polipéptidos normalmente expresados en la célula huésped, mientras que otras porciones contienen secuencias de aminoácidos que son extrañas a la célula huésped. Adicional

o alternativamente, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos a partir de dos o más polipéptidos diferentes que normalmente se expresan en la célula huésped. Además, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos que son extraños a la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica genéticamente mediante la activación o regulación positiva de uno o más genes endógenos.

- 5 Con frecuencia, cualquier proteína que pueda separarse deseablemente de acuerdo con la presente invención se seleccionará basándose en una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear para separar cualquier anticuerpo, receptor, citoquina, factor de crecimiento, enzima, factor de coagulación, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, farmacéutica o comercialmente relevante, entre otros. La siguiente lista de proteínas que se pueden separar según la presente invención es meramente de naturaleza ejemplar, y no pretende ser una recitación limitante. Una persona con experiencia normal en el arte entenderá que cualquier proteína se puede expresar de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular que se va a producir en base a las necesidades.

Anticuerpos y fragmentos de unión

15 Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son por lo general proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda y kappa, se pueden encontrar en los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Cada cadena ligera incluye un dominio (VL) variable (V) N-terminal y un dominio (CL) constante (C). Cada cadena pesada incluye un dominio (VH) N-terminal V, tres o cuatro dominios C (CHs) y una región bisagra. El dominio CH más próximo a VH se designa como CHI. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas llamadas regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un andamio para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las CDRs contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDRs se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. De acuerdo con lo anterior, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. CDR3 es por lo general la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o mayor que 26 aminoácidos. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura del anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Un experto en el arte reconocerá que cada estructura de subunidad, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, por ejemplo, la parte de la subunidad VH, VL, o CDR se une al antígeno, esto es, el fragmento de unión al antígeno, o, por ejemplo, la parte de la subunidad CH que se une y/o activa, por ejemplo, un receptor Fc y/o complemento. Las CDRs por lo general se refieren a las CDRs de Kabat, como se describe en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al. Otro estándar para caracterizar el sitio de unión al antígeno es referirse a los bucles hipervariables como lo describe Chothia. Véase, por ejemplo, Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Otro estándar más es la definición de AbM usada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a las CDRs de Kabat pueden implementarse alternativamente usando relaciones descritas similares con respecto a los bucles hipervariables de Chothia o los bucles definidos por AbM.

45 Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno, y por lo general dos, dominios VH o porciones de los mismos, y/o al menos uno, y por lo general dos, dominios VL o porciones de los mismos. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera están interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o partes de los mismos, se puede obtener de cualquier origen, incluidos roedores, primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos), camélidos (por ejemplo, camellos o llamas), así como producidos de forma recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados, y/o generados in vitro, como se describe con más detalle en este documento.

55 Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CHI; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable camélido o camelizado; (vii) una cadena única Fv (scFv); y (viii) un anticuerpo biespecífico. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazante sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-

26; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83). Tales anticuerpos de cadena única también pretenden incluirse dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en el arte y los fragmentos se evalúan para determinar su funcionamiento de la misma manera que los anticuerpos intactos.

- 5 El fragmento de unión a antígeno puede incluir, opcionalmente, una unidad estructural que mejora uno o más de, por ejemplo, la estabilidad, la función de las células efectoras o la fijación del complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede incluir una unidad estructural pegilada, albúmina o una región constante de cadena pesada y/o ligera (o una parte del mismo).

- 10 Aparte de los anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "bienespecífico" o "anticuerpo bifuncional", o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo híbrido artificial o fragmento del mismo que tiene dos sitios de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden producir mediante una variedad de procedimientos que incluyen la fusión de hibridomas, la unión de fragmentos de Fab' o de forma recombinante. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

- 15 Se dispone de numerosos procedimientos conocidos para los expertos en el arte para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir por generación de hibridomas de acuerdo con procedimientos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera se examinan luego usando procedimientos estándar, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón de superficie (Biacore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno específico. Se puede usar cualquier forma del antígeno especificado como inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmento del mismo, así como su péptido antigénico.

- 20 Un procedimiento de ejemplo para fabricar anticuerpos incluye el cribado de bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de visualización de fagos o ribosomas. La visualización de fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

- 25 Además del uso de bibliotecas de visualización, el antígeno especificado se puede usar para inmunizar un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, un hámster o una rata. En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos. Usando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, y Solicitud PCT No. PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996.

- 30 En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal a partir del animal no humano, y luego se modifica, por ejemplo, quimérico, desinmunizado, humanizado, se puede producir usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Se han descrito una variedad de enfoques para hacer anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al, Nature 314:452, 1985, Cabilly et al, la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Boss et al, la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397; Tanaguchi *et al*, European Patent Publication EP171496; European Patent Publication 0173494, United Kingdom Patent GB 2177096B. Los anticuerpos humanizados también se pueden producir, por ejemplo, usando ratones transgénicos que expresan genes de cadena pesada y ligera humanos, pero son incapaces de expresar los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un ejemplo de procedimiento de injerto de CDR que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados descritos en este documento (Patente de Estados Unidos No. 5,225,539). Todas las CDRs de un anticuerpo humano particular se pueden reemplazar con al menos una parte de una CDR no humana, o solo algunas de las CDRs se pueden reemplazar con CDRs no humanas. Solo es necesario reemplazar el número de CDRs requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

- 35 40 45 50 55 Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se pueden generar reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión de antígeno con secuencias equivalentes a partir de dominios variables Fv humanos. Procedimientos de ejemplo para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan por Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; por Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; y por los documentos US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; y US 6,407,213. Esos procedimientos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina a partir de al menos uno de una cadena pesada o ligera. Tales ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado, como se describe anteriormente, así como a partir de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado se puede clonar luego en un vector de expresión apropiado.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal y/o mutaciones inversas. Tales moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden fabricar mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982), y se puede hacer según las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400).

Un anticuerpo o fragmento del mismo también se puede modificar por eliminación específica de epítomos de células T humanas o "desinmunización" por los procedimientos revelados en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. En resumen, los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo se pueden analizar para determinar los péptidos que se unen a MHC Clase II; estos péptidos representan posibles epítomos de célula T (como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de posibles epítomos de células T, se puede aplicar un enfoque de modelado computarizado denominado "hebra peptídica", y además se puede buscar una base de datos de péptidos de unión a MHC de clase II humanos en busca de motivos presentes en las secuencias V_H y V_L, como se describe en WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 principales alotipos MHC clase II DR y, de este modo, constituyen epítomos de células T potenciales. Los posibles epítomos de células T detectados se pueden eliminar sustituyendo pequeños números de residuos de aminoácidos en los dominios variables, o preferiblemente, por sustituciones de aminoácidos simples. Por lo general, se hacen sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se revelan en Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) Immunol Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio completo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Estas secuencias se pueden usar como fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones marco y CDRs. Las regiones del marco humano de consenso también se pueden usar, por ejemplo, como se describe en el documento US 6,300,064.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede contener una constante de inmunoglobulina alterada o región Fc. Por ejemplo, un anticuerpo producido de acuerdo con las enseñanzas en este documento se puede unir más fuertemente o con más especificidad a moléculas efectoras como el complemento y/o los receptores Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo como la actividad de las células efectoras, la lisis, la actividad mediada del complemento, aclaramiento de anticuerpos y vida media de anticuerpos. Los receptores Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII y FcRn, incluidas variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc se revisan en Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92, 1991; Capel et al., Immunomethods 4:25-34, 1994; y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41, 1995).

Los ejemplos de anticuerpos que se pueden separar por los procedimientos de la invención, incluyen anticuerpos contra A β , IL-13, IL-22, GDF8 y 5T4. Cada uno de estos anticuerpos se describe con más detalle a continuación y en los ejemplos adjuntos.

Anticuerpos Anti-A β

Como se describe en los ejemplos adjuntos, los anticuerpos anti-AB se pueden separar por los procedimientos de la invención. Los términos "anticuerpo AB", "anticuerpo A β ", "anticuerpo anti-A β " y "anti-A β " se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a un anticuerpo que se une a uno o más epítomos o determinantes antigénicos de APP, proteína A β , o ambos. Epítomos o determinantes antigénicos de ejemplo se pueden encontrar dentro de la proteína precursora de amiloide humana (APP), pero se encuentran preferiblemente dentro del péptido A β de la APP. Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. A los aminoácidos dentro de la APP se les asignan números según la secuencia de la isoforma APP⁷⁷⁰ (véase, por ejemplo, el número de acceso de GenBank P05067). El péptido A β (también denominado en este documento péptido beta amiloide y A beta) es un fragmento interno de ~4 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (A β 39, A β 40, A β 41, A β 42, y A β 43). A β 40, por ejemplo, consiste en los residuos 672-711 de APP y A β 42 consiste en los residuos 672-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasas in vivo o in situ, A β se encuentra tanto en una "forma corta", con una longitud de 40 aminoácidos, y una "forma larga", que varía entre 42-43 aminoácidos. ácidos de longitud. Los epítomos o determinantes antigénicos se pueden ubicar dentro del terminal N del péptido A β e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 de A β , preferiblemente de los residuos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-7, 3-6, o 3-7 de A β 42 o dentro de los residuos 2-4, 5, 6, 7 u 8 de A β , residuos 3-5, 6, 7, 8, o 9 de A β , o residuos 4-7, 8, 9 o 10 de A β 42. Los epítomos "centrales" o los determinantes antigénicos se encuentran dentro de la parte central o media del péptido A β e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 19-21, 19-22, 19-23, o 19-24 de A β . Los epítomos "C-terminales" o los determinantes antigénicos están localizados dentro del terminal C del péptido A β e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 33-40, 33-41 o 33-42 de A β .

En diversas realizaciones, un anticuerpo A β es específico del extremo. Como se usa en este documento, el término "específico del extremo" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a los residuos N-terminales o C-

terminales de un péptido A β pero que no reconoce los mismos residuos cuando están presentes en una especie de A β más largo que comprenden los residuos o en la APP.

En diversas realizaciones, un anticuerpo A β es "específico del extremo C". Como se usa en este documento, el término "específico del terminal C" significa que el anticuerpo reconoce específicamente un terminal C libre de un péptido A β . Los ejemplos de anticuerpos A β específicos del terminal C incluyen aquellos que: reconocen un péptido A β que termina en el residuo 40, pero no reconocen un péptido A β que termina en los residuos 41, 42 y/o 43; reconocen un péptido A β que termina en el residuo 42, pero no reconocen un péptido A β que termina en el residuo 40, 41 y/o 43; etc.

En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 3D6 o variante del mismo, o un anticuerpo 10D5 o variante del mismo, ambos de los cuales se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0165496A1, la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0087777A1, la Publicación de Patente Internacional No. WO02/46237A3. La descripción de 3D6 y 10D5 también se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional No. WO02/088306A2 y la Publicación de Patente Internacional No. WO02/088307A2. 3D6 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a un epítipo N-terminal ubicado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los residuos 1-5. En comparación, 10D5 es un mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal ubicado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los residuos 3-6. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12B4 o una variante del mismo, como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040082762A1 y la Publicación de Patente Internacional No. WO03/077858A2. 12B4 es un mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal ubicado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los residuos 3-7. En otra realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12A11 o una variante del mismo, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/858,855 y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US04/17514. 12A11 es un mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal ubicado en el péptido β -amiloide humano, específicamente, los residuos 3-7. En otra realización más, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 266 como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/789,273, y la Solicitud de Patente Internacional No. WO01/62801A2. Los anticuerpos diseñados para unirse específicamente a los epítopos C-terminales localizados en el péptido β -amiloide humano, para uso en la presente invención incluyen 369.2B, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.786.160.

En realizaciones de ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo anti-péptido A β 3D6 humanizado que se une selectivamente al péptido A β . Más específicamente, el anticuerpo humanizado anti péptido A β 3D6 está diseñado para unirse específicamente a un epítipo NH₂-terminal ubicado en el péptido β -amiloide 1-40 o 1-42 humano encontrado en depósitos de placa en el cerebro (por ejemplo, en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer).

Los anticuerpos anti-AB se pueden usar para tratar enfermedades amiloidogénicas, en particular, la enfermedad de Alzheimer. El término "enfermedad amiloidogénica" incluye cualquier enfermedad asociada con (o causada por) la formación o deposición de fibrillas de amiloide insolubles. Las enfermedades amiloidogénicas de ejemplo incluyen la amiloidosis sistémica, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de inicio maduro, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la demencia fronto-temporal y las encefalopatías espongiiformes transmisibles relacionadas con el prión (enfermedad de Kuru y Creutzfeldt-Jacob en humanos y prurito lumbar y EEB en ovejas y ganado, respectivamente). Se definen o caracterizan diferentes enfermedades amiloidogénicas por la naturaleza del componente polipeptídico de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen la enfermedad de Alzheimer, la proteína β -amiloide (por ejemplo, proteína de tipo salvaje, variante o proteína β -amiloide truncada) es el componente polipeptídico característico del depósito de amiloide. De acuerdo con lo anterior, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de A β " o una "enfermedad asociada con depósitos de A β ", por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente. Los términos "proteína β -amiloide", "péptido β -amiloide", " β -amiloide", "A β " y "péptido A β " se usan indistintamente en este documento.

Anticuerpos Anti-5T4

El antígeno 5T4 se ha caracterizado previamente (véase, por ejemplo, el documento WO 89/07947). Se conoce la secuencia completa de ácido nucleico del 5T4 humano (Myers et al. (1994) J Biol Chem 169: 9319-24 y GenBank en No. de acceso Z29083). La secuencia para el antígeno 5T4 de otras especies también se conoce, por ejemplo, 5T4 murino (documento WO00/29428), 5T4 canino (documento WO01/36486) o 5T4 felino (US 05/0100958).

El 5T4 humano es una glicoproteína de aproximadamente 72 kDa expresada ampliamente en carcinomas, pero que tiene un patrón de expresión altamente restringido en tejidos adultos normales. Parece estar fuertemente correlacionada con la metástasis en el cáncer colorrectal y gástrico. La expresión del antígeno 5T4 también se encuentra con alta frecuencia en los cánceres de mama y ovario (Starzynska et al. (1998) Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 10:479-84; Starzynska et al. (1994) Br. J. Cancer 69:899-902; Starzynska et al. (1992) Br. J. Cancer 66:867-9). 5T4 se ha propuesto como un marcador, con posible participación mecánica, para la progresión del tumor y el potencial de metástasis (Carsberg et al. (1996) Int J Cancer 68:84-92). 5T4 también se ha propuesto para su uso

como agente inmunoterapéutico (véase el documento WO 00/29428). Los péptidos antigénicos de 5T4 se revelan, por ejemplo, en el documento US 05/0100958.

Varias solicitudes pendientes se refieren en general a ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo monoclonal anti-5T4, vectores y células huésped de los mismos, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2003/0018004 y 2005/0032216. Se ha presentado una solicitud de patente provisional que pertenece en general a los anticuerpos monoclonales anti-5T4 H8 humanizados y sus conjugados de caliqueamicina, así como a los procedimientos de tratamiento que usan estos conjugados de caliqueamicina (Publicación de Solicitud Patente de los Estados Unidos No. 2006/0088522).

Anticuerpos Anti-IL13

Otros anticuerpos de ejemplo que se pueden separar por los procedimientos de la invención son anticuerpos anti-IL-13. La interleuquina-13 (IL-13) es una citoquina previamente caracterizada secretada por linfocitos T y mastocitos (McKenzie et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3735-39; Bost et al. (1996) Immunology 87:663-41). El término "IL-13" se refiere a la interleuquina-13, que incluye la forma precursora sin procesar de longitud completa de la IL-13, así como las formas maduras que resultan de la escisión postraduccional. El término también se refiere a cualquier fragmento y variante de la IL-13 que mantiene al menos algunas actividades biológicas asociadas con la IL-13 madura, incluidas las secuencias que se han modificado (por ejemplo, modificadas de forma recombinante). El término "IL-13" incluye la IL-13 humana, así como otras especies de vertebrados. Varias solicitudes pendientes revelan anticuerpos contra los péptidos IL-13, IL-13 humanos y de mono, vectores y células huésped que producen los mismos, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2006/0063228A y 2006/0073148.

La IL-13 comparte varias actividades biológicas con IL-4. Por ejemplo, tanto IL-4 como IL-13 pueden causar el cambio de isotipo de IgE en células B (Tomkinson et al. (2001) J. Immunol. 166:5792-5800). Además, se han informado niveles elevados de CD23 en la superficie celular y CD23 en suero (sCD23) en pacientes asmáticos (Sanchez-Guererro et al. (1994) Allergy 49:587-92; DiLorenzo et al. (1999) Allergy Asthma Proc. 20:119-25). Además, tanto IL-4 como IL-13 pueden regular positivamente la expresión de MHC clase II y el receptor de baja afinidad IgE (CD23) en células B y monocitos, lo que resulta en una mejor presentación del antígeno y una función macrófaga regulada (Tomkinson et al., *supra*). Estas observaciones sugieren que la IL-13 puede ser un jugador importante en el desarrollo de la eosinofilia de las vías aéreas y la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) (Tomkinson et al., *supra*; Wills-Karp et al. (1998) Science 282:2258-61). De acuerdo con lo anterior, la inhibición de IL-13 puede ser útil para mejorar la patología de un número de afecciones inflamatorias y/o alérgicas, que incluyen trastornos respiratorios, por ejemplo, asma; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); otras afecciones que involucran inflamación de las vías respiratorias, eosinofilia, fibrosis y exceso de producción de moco, por ejemplo, fibrosis quística y fibrosis pulmonar; trastornos atópicos, por ejemplo, dermatitis atópica, urticaria, eccema, rinitis alérgica; afecciones inflamatorias y/o autoinmunes de la piel (por ejemplo, dermatitis atópica), órganos gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn), hígado (por ejemplo, cirrosis, carcinoma hepatocelular); esclerodermia; tumores o cánceres (por ejemplo, tumores de tejidos blandos o sólidos), tal como leucemia, glioblastoma y linfoma, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; infecciones virales (por ejemplo, a partir de HTLV-1); fibrosis de otros órganos, por ejemplo, fibrosis del hígado (por ejemplo, fibrosis causada por un virus de la hepatitis B y/o C).

Anticuerpos Anti-IL22

Otros anticuerpos de ejemplo que se pueden separar por los procedimientos de la invención son anticuerpos anti-IL-22. La interleuquina-22 (IL-22) es una citoquina de clase II caracterizada previamente que muestra una homología de secuencia con la IL-10. Su expresión está regulada positivamente en células T por IL-9 o ConA (Dumoutier L. et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(18):10144-9). Los estudios han demostrado que la expresión del ARNm de IL-22 se induce in vivo en respuesta a la administración de LPS, y que la IL-22 modula los parámetros indicativos de una respuesta de fase aguda (Dumoutier L. et al. (2000) *supra*; Pittman D. et al. (2001) *Genes and Immunity* 2:172), y que una reducción de la actividad de IL-22 mediante el uso de un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante mejora los síntomas inflamatorios en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) de ratón. De este modo, los antagonistas de IL-22, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-22 neutralizantes y fragmentos de los mismos, se pueden usar para inducir la supresión inmune in vivo, por ejemplo, para tratar trastornos autoinmunes (por ejemplo, trastornos artríticos tales como artritis reumatoide); trastornos respiratorios (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)); afecciones inflamatorias de, por ejemplo, la piel (por ejemplo, psoriasis), sistema cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis), sistema nervioso (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), riñones (por ejemplo, nefritis), hígado (por ejemplo, hepatitis) y páncreas (por ejemplo, pancreatitis).

El término "IL-22" se refiere a la interleuquina-22, que incluye la forma de precursor sin procesar de longitud completa de la IL-22, así como las formas maduras que resultan de la escisión postraduccional. El término también se refiere a cualquier fragmento y variante de la IL-22 que mantiene al menos algunas actividades biológicas asociadas con la IL-22 madura, incluidas las secuencias que se han modificado. El término "IL-22" incluye la IL-22 humana, así como otras especies de vertebrados. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la IL-22 humana

y de roedor, así como los anticuerpos contra la IL-22 se revelan, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2005-0042220 y 2005-0158760, y la Patente de los Estados Unidos No. 6,939,545.

Anticuerpos Anti-GDF8

5 Otros anticuerpos de ejemplo que se pueden separar mediante los procedimientos de la invención son anticuerpos anti-GDF8. El factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF-8), también conocido como miostatina, es una proteína secretada y es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), todos los cuales poseen propiedades reguladoras del crecimiento y morfogenéticas de importancia fisiológica Kingsley et al. (1994) *Genes Dev.*, 8: 133-146; Hoodless et al. (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 228: 235-272). De manera similar al TGF- β , el GDF-8 humano se sintetiza como una proteína precursora larga de 375 aminoácidos. La proteína GDF-8 precursora forma un homodímero. Durante el procesamiento, el propéptido amino terminal se escinde en Arg-266. El propéptido escindido, conocido como el "péptido asociado a la latencia" (LAP), puede permanecer unido no covalentemente al homodímero, inactivando así el complejo (Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 7646-7654; Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43 y Thies et al. (2001) *Growth Factors*, 18: 251-259). El complejo de GDF-8 maduro con propéptido se conoce comúnmente como "complejo latente pequeño" (Gentry et al. (1990) *Biochemistry*, 29: 6851- 6857; Derynck et al. (1995) *Nature*, 316: 701-705; y Massague (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.*, 12: 597-641). También se sabe que otras proteínas se unen a GDF-8 maduro e inhiben su actividad biológica. Tales proteínas inhibitorias incluyen la follistatina y las proteínas relacionadas con la follistatina (Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

20 El término "GDF-8" se refiere al factor de crecimiento y diferenciación-8 y, cuando sea apropiado, a factores que están relacionados estructural o funcionalmente con el GDF-8, por ejemplo, BMP-11 y otros factores que pertenecen a la superfamilia TGF- β . El término se refiere a la forma de precursor sin procesar de longitud completa de GDF-8, así como a las formas maduras y propeptídicas que resultan de la escisión postraducciona. El término también se refiere a los fragmentos y variantes de GDF-8 que mantienen al menos algunas actividades biológicas asociadas con GDF-8 maduro, incluidas las secuencias que se han modificado. La secuencia de aminoácidos del GDF-8 humano, así como muchas otras especies de vertebrados (incluyendo murino, babuino, bovino, pollo) se revela, por ejemplo, documentos US 2004-0142382, US 2002-0157125, y McPherron et al. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:12457-12461. Ejemplos de anticuerpos neutralizantes contra GDF-8 se revelan, por ejemplo, en el documento US 2004-0142382, y se pueden usar para tratar o prevenir afecciones en las que es deseable un aumento en el tejido muscular o la densidad ósea. Las enfermedades y trastornos de ejemplo incluyen trastornos musculares y neuromusculares, tales como la distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); la esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular; atrofia de órganos; fragilidad; síndrome del túnel; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva; sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular; trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X); resistencia a la insulina inducida por traumas tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno; y enfermedades degenerativas óseas (por ejemplo, osteoartritis y osteoporosis)

Receptores solubles y fusiones de receptores

40 En algunas realizaciones, las proteínas separadas por los procedimientos de la invención pueden ser receptores solubles o fragmentos de los mismos. Los ejemplos de receptores solubles incluyen el dominio extracelular de un receptor, tal como los receptores alfa y beta del factor de necrosis tumoral soluble (TNFR-1; EP 417,563 publicado el 20 de marzo de 1991; TNFR-2, EP 417,014 publicado el 20 de marzo de 1991; y revisado en Naismith and Sprang, *J Inflamm.* 47(1-2):1-7, 1995-96). En otras realizaciones, el receptor soluble incluye el dominio extracelular del receptor de interleuquina-21 (IL-21R) como se describe, por ejemplo, en el documento US 2003-0108549.

45 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención se usan para separar fusiones de receptores solubles. La proteína de fusión puede incluir una unidad estructural dirigida, por ejemplo, un fragmento de receptor soluble o un ligando, y una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fc, una región constante de la cadena pesada de los diversos isotipos, que incluyen: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE). Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de un receptor y, por ejemplo, fusionarse con una cadena Fc de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana, o una forma mutada de la misma). En una realización, la secuencia de Fc humana se ha mutado en uno o más aminoácidos, por ejemplo, se ha mutado en los residuos 254 y 257 a partir de la secuencia de tipo salvaje para reducir la unión del receptor de Fc. Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazante que une la primera unidad estructural a la segunda unidad estructural, por ejemplo, el fragmento de inmunoglobulina. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un péptido enlazante, por ejemplo, un péptido enlazante de 4 a 20, más preferiblemente, de 5 a 10 aminoácidos de longitud; el péptido enlazante tiene 8 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un péptido enlazante que tiene la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) y en la que y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En otras realizaciones, se pueden añadir secuencias de aminoácidos adicionales al terminal N- o C- de la proteína de fusión para facilitar la expresión, flexibilidad estérica, detección y/o aislamiento o purificación.

En ciertas realizaciones, la fusión del receptor soluble comprende una TNFR-Ig soluble (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, un receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (por ejemplo, receptor de TNF de 75 kD fusionado a una parte Fc de IgG1 humana).

5 Una proteína quimérica o de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntos en el marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos de extremo romo o de extremo escalonado para la unión, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos, según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y unión enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser hibridados y reamplificados para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente que codifican una unidad estructural de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). El polipéptido de fusión con inmunoglobulina se conoce en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; y 5,455,165.

Factores de crecimiento y citoquinas

20 Otra clase de polipéptidos que se ha demostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que se pueden producir de manera deseable según las enseñanzas de la presente invención incluyen factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, tales como citoquinas.

Los factores de crecimiento por lo general son glicoproteínas que son secretadas por las células y se unen a y activan receptores en otras células, iniciando un cambio metabólico o de desarrollo en la célula receptora. Los ejemplos de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización incluyen citoquinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), tales como aFGF y bFGF; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 o TGF-beta 5; factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similares a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón como el interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (TL), por ejemplo, IL-1 a IL-13 (por ejemplo, IL-11); factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora folicular; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tal como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hemopoyético; encefalina; RANTES (reguladas en la activación normalmente expresado de células T y secretada); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factores neurotróficos tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tales como NGF-beta. Un experto en el arte conocerá otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que se pueden expresar de acuerdo con procedimientos los procedimientos y composiciones de la presente invención.

45 Se ha demostrado que las alteraciones específicas en el patrón de glicosilación de los factores de crecimiento u otras moléculas de señalización tienen efectos dramáticos sobre sus propiedades terapéuticas. Como un ejemplo, un procedimiento común de tratamiento para pacientes que sufren de anemia crónica es proporcionarles inyecciones frecuentes de eritropietina humana recombinante (rHuEPO) para aumentar su producción de glóbulos rojos. Un análogo de rHuEPO, darbepoetina alfa (Aranesp®), se ha desarrollado para tener una duración más larga que la rHuEPO normal. La principal diferencia entre darbepoetina alfa y rHuEPO es la presencia de dos cadenas de oligosacáridos unidas a N que contienen el ácido siálico adicionales. La producción de darbepoetina alfa se ha realizado usando la glicoingeniería in vitro (véase Elliott et al., Nature Biotechnology 21(4):414-21, 2003). Elliott et al. usaron la mutagénesis in vitro para incorporar sitios de glicosilación adicionales en el esqueleto del polipéptido rHuEPO, dando como resultado la expresión del análogo de darbepoetina alfa. Las cadenas de oligosacáridos adicionales se ubican distales al sitio de unión del receptor de EPO y aparentemente no interfieren con la unión del receptor. Sin embargo, la vida media de darbepoetina alfa es hasta tres veces más alta que rHuEPO, lo que resulta en un agente terapéutico mucho más eficaz.

Factores de coagulación

60 Los factores de coagulación han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales. La hemofilia B es un trastorno en el que la sangre del paciente no puede coagularse. De este modo, cualquier pequeña herida

que resulte en una hemorragia es un evento potencialmente mortal. Por ejemplo, el factor de coagulación IX (Factor IX o "FIX") es una glicoproteína de cadena única cuya deficiencia produce hemofilia B. FIX se sintetiza como un zimógeno de cadena única que se puede activar en una serina proteasa de dos cadenas (Factor IXa) por liberación de un péptido de activación. El dominio catalítico del factor IXa se encuentra en la cadena pesada (véase Chang et al., J. Clin. Invest., 100:4, 1997). FIX tiene múltiples sitios de glicosilación que incluyen tanto carbohidratos unidos a N como unidos a O. Una estructura particular unida a O en la Serina 61 (Sia- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O-Ser) una vez se pensó única para FIX pero desde entonces se ha encontrado en un algunas otras moléculas, incluida la proteína Notch en mamíferos y Drosophila (Maloney et al, Journal of Biol. Chem., 275(13), 2000). El FIX producido por células de ovario de hámster chino ("CHO") en cultivo celular muestra cierta variabilidad en la cadena de oligosacáridos de Serina 61. Estas diferentes glicoformas, y otras glicoformas potenciales, pueden tener diferentes habilidades para inducir la coagulación cuando se administran a humanos o animales y/o pueden tener diferentes estabildades en la sangre, lo que resulta en una coagulación menos eficaz.

La hemofilia A, que es clínicamente indistinguible de la hemofilia B, es causada por un defecto en el factor de coagulación VIII humano, otra glicoproteína que se sintetiza como una cadena única y luego se procesa en una forma activa de dos cadenas. La presente invención también se puede emplear para controlar o alterar el patrón de glicosilación del factor VIII de coagulación con el fin de modular su actividad de coagulación. Otros factores de coagulación que se pueden producir de acuerdo con la presente invención incluyen el factor tisular y el factor de von Willebrands.

Enzimas

Otra clase de polipéptidos que se ha demostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que se pueden producir de manera deseable según las enseñanzas de la presente invención incluyen enzimas. Las enzimas pueden ser glicoproteínas cuyo patrón de glicosilación afecta la actividad enzimática. De este modo, la presente invención también se puede usar para producir enzimas en un cultivo celular en el que las enzimas producidas tienen un patrón de glicosilación más extenso o, por lo demás, más deseable.

Como ejemplo, una deficiencia en glucocerebrosidasa (GCR) da como resultado una condición conocida como enfermedad de Gaucher, que es causada por una acumulación de glucocerebrosidasa en lisosomas de ciertas células. Los sujetos con enfermedad de Gaucher presentan una serie de síntomas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastorno esquelético, trombocitopenia y anemia. Friedman and Hayes mostraron que el GCR recombinante (rGCR) que contenía una única sustitución en la secuencia de aminoácidos primaria presentaba un patrón de glicosilación alterado, específicamente un aumento en los residuos de fucosa y N-acetil glucosamina en comparación con el GCR de origen natural (véase la Patente de los Estados Unidos Número 5,549,892).

Friedman and Hayes también demostraron que este rGCR exhibía propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con el rGCR de origen natural. Por ejemplo, aproximadamente el doble de la rGCR apuntó a las células de Kupffer del hígado que la GCR de origen natural. Aunque las secuencias de aminoácidos primarias de las dos proteínas difieren en un solo residuo, Friedman and Hayes plantean la hipótesis de que el patrón de glicosilación alterado de tGCR también puede influir en la orientación a las células de Kupffer. Un experto en el arte conocerá otros ejemplos conocidos de enzimas que exhiben propiedades enzimáticas, farmacocinéticas y/o farmacodinámicas alteradas que resultan de una alteración en sus patrones de glicosilación.

Producción de proteínas

Las proteínas separadas por los procedimientos de la invención se pueden producir de forma recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. La secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas se inserta por lo general en un vector de expresión para la introducción en células huésped que se puede usar para producir la cantidad deseada de anticuerpo modificado que, a su vez, proporciona los polipéptidos. El término "vector" incluye una construcción de ácido nucleico que a menudo incluye un ácido nucleico, por ejemplo, un gen, y que incluye además elementos mínimos necesarios para la replicación de ácido nucleico, la transcripción, la estabilidad y/o la expresión de proteínas de una célula huésped. Tales construcciones pueden existir como elementos extracromosómicos o se pueden integrar en el genoma de una célula huésped.

El término "vector de expresión" incluye un tipo específico de vector en el que la construcción de ácido nucleico se optimiza para la expresión de alto nivel de un producto proteico deseado. Los vectores de expresión a menudo tienen agentes reguladores de la transcripción, tales como elementos promotores y potenciadores, optimizados para altos niveles de transcripción en tipos de células específicos y/u optimizados de tal manera que la expresión es constitutiva en base al uso de un agente inductor específico. Los vectores de expresión tienen además secuencias que proporcionan una traducción apropiada y/o mejorada de la proteína. Tal como conocen los expertos en el arte tales vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. El término "casete de expresión" incluye una construcción de ácido nucleico que contiene un gen y tiene elementos además del gen que permite la expresión apropiada y/o mejorada de ese gen en una célula huésped. Para producir anticuerpos, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas se pueden insertar en vectores de expresión. Tales secuencias pueden estar presentes en la misma molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el mismo

vector de expresión) o, alternativamente, pueden expresarse a partir de moléculas de ácido nucleico separadas (por ejemplo, vectores de expresión separados).

El término "unido operativamente" incluye una yuxtaposición en la que los componentes están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista (por ejemplo, funcionalmente vinculados). Como ejemplo, un promotor/potenciador unido operativamente a un polinucleótido de interés se liga a dicho polinucleótido de manera que la expresión del polinucleótido de interés se logra en condiciones que activan la expresión dirigida por el promotor/potenciador.

Los vectores de expresión son por lo general replicables en los organismos hospedadores ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la kanamicina o resistencia a la neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura et al., la Patente de los Estados Unidos No. 4,704,362). Además de las secuencias de casete de ADN de inmunoglobulina, las secuencias de inserción y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, por lo general el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Una vez que el vector se ha incorporado en la célula huésped apropiada, la célula huésped se mantiene en condiciones apropiadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos deseados. De acuerdo con la presente invención, puede utilizarse cualquier célula huésped susceptible de cultivo celular y de expresión de proteínas o polipéptidos. En ciertas realizaciones, la célula huésped es mamífero. Los ejemplos de células de mamífero que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59, 1977); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216,1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982); células MRC 5; Células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier número de líneas celulares de hibridoma disponibles comercialmente y no comercialmente que expresen polipéptidos o proteínas. Un experto en el arte apreciará que las líneas celulares de hibridoma pueden tener diferentes requisitos de nutrición y/o pueden requerir diferentes condiciones de cultivo para un crecimiento óptimo y una expresión de polipéptidos o proteínas, y podrán modificar las condiciones según sea necesario.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tal como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus. Véase, por ejemplo, Co et al., (1992) *J. Immunol.* 148:1149. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de promotor FF-1a y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales y las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,168,062 por Stinski, la Patente de los Estados Unidos No. 4,510,245 de Bell et al. y la Patente de los Estados Unidos No. 4,968,615 de Schaffner et al. En realizaciones de ejemplo, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están unidos operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador de potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador de potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. En realizaciones de ejemplo de la invención, la construcción incluye un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para

proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos de la invención en células huésped eucariotas. Las secuencias IRES compatibles se revelan en la Patente de los Estados Unidos No. 6,193,980.

5 Alternativamente, las secuencias codificantes se pueden incorporar en un transgén para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, y Meade et al., US 5,849,992). Los transgenes apropiados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operable con un promotor y potenciador a partir de un gen específico de la glándula mamaria, tal como la caseína o la beta-lactoglobulina.

10 Las células huésped procariotas también pueden ser apropiadas para producir los anticuerpos de la invención. *E. coli* es un huésped procariótico particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros huéspedes microbianos apropiados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, *Salmonella* y *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, también se pueden hacer vectores de expresión, que por lo general contendrán secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores por lo general controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosomas, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

20 La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas ya sea de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a un anticuerpo codificado en ellos, a menudo a la región constante del anticuerpo recombinante, sin afectar la especificidad o el reconocimiento del antígeno del anticuerpo. La adición de los aminoácidos del péptido de fusión puede añadir una función adicional al anticuerpo, por ejemplo, como un marcador (por ejemplo, una etiqueta de epítipo como myc o flag).

25 Otros microbios, tales como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores apropiados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación, según se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa.

30 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían según el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se usa comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección basada en el virus se pueden usar para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989). Otros procedimientos usados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase en general, Sambrook et al., supra). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden ser microinyectados en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células se transfieren a ovocitos enucleados.

35 Cuando se clonan cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, los vectores se cotransfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden separar como se describe en este documento y/o purificarse adicionalmente según los procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel (véase en general Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos 90 a 95 % de homogeneidad, y los más preferidos, para usos farmacéuticos de 98 a 99 % o más de homogeneidad.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos.

50 **Ejemplo 1**

Floculación con diversos cationes y aniones: se produjeron diversos anticuerpos monoclonales (mAb) (que se muestran en la tabla 1) mediante células de ovario de hámster chino (CHO) recombinantes cultivadas en medios sin suero. Aproximadamente 50 ml de los medios condicionados que contenían células se dividieron en partes alícuotas en matraces Erlenmeyer de 125 ml (excepto el ejemplo de fosfato de calcio 30/20 con anti-GDF8 # 2 que tenía 400 ml en un matraz de 1000 ml y el ejemplo de fosfato de calcio 30/20 con anti-IL13 #1 que tenía 1000 ml en un matraz de 2000 ml). Se añadió HEPES a 40 mM para controlar el pH. Se añadió una solución concentrada de cationes metálicos a la solución para lograr una concentración diana final (véase la tabla 1) y se mezcló suavemente. Se añadió una solución concentrada de aniones a la mezcla (véase la tabla 1) para lograr la concentración final de

aniones y se mezcló suavemente (en algunos de los ejemplos, indicados con un asterisco (*) en la tabla 1 a continuación, primero se añadió el anión y en segundo lugar el catión). El pH se incrementó por la adición de NaOH o disminuyó por la adición de HCl al rango de pH diana. En muchos de los ejemplos, no fue necesario ajustar el pH. La mezcla se dejó incubar en un agitador a 18-25 °C durante una a cuatro horas junto con controles negativos. Después de la incubación, la mezcla se vertió en un tubo de centrifuga de 50 ml. Cada mezcla se centrifugó a 340 g durante diez minutos. El sobrenadante clarificado se dividió en alícuotas y la turbidez se midió usando un nefalómetro (HACH, Loveland CO). La turbidez resultante se informa en la tabla 1 como una reducción porcentual con respecto a la del control no tratado. La concentración de anticuerpos se midió mediante un procedimiento de HPLC con Proteína A general para anticuerpos. La recuperación en comparación con el control no tratado se informa en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados de la floculación para los cationes calcio, magnesio, manganeso, cobalto (II) y níquel. Todos los tratamientos se realizaron con la adición de un catión antes del anión, excepto cuando se indica con un asterisco (*), donde el anión se añadió antes del catión.

Calcio						
Anión	Catión/Anión- (mM)	Producto de Concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB #1	65 %	91 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,0	anti-AB #1	89 %	77 %
Fosfato	80/80	6,4E-03	5,4	anti-AB #1	95 %	56 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	7	anti-AB #1	73 %	90 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,5	anti-AB #1	74 %	87 %
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB #1	82 %	92 %
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,0	anti-AB #1	53 %	95 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,5	anti-AB #1	96 %	79 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,0	anti-AB #1	96 %	80 %
Fosfato	10/10	1,0E-04	7	anti-AB #1	42 %	112 %
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB #1	81 %	93 %
Fosfato	20/20	4,0E-04	7,0	anti-AB #1	81 %	94 %
Fosfato	20/20	4,0E-04	7,5	anti-AB #1	86 %	97 %
Fosfato	20/40	8,0E-04	6,5	anti-AB #1	68 %	92 %
Fosfato	20/40	8,0E-04	7,0	anti-AB #1	67 %	92 %
Fosfato	20/40	8,0E-04	7,5	anti-AB #1	61 %	107 %
Fosfato	40/20	8,0E-04	6,5	anti-AB #1	98 %	82 %
Fosfato	40/20	8,0E-04	7,0	anti-AB #1	98 %	96 %
Fosfato	40/20	8,0E-04	7,5	anti-AB #1	98 %	97 %

ES 2 704 040 T3

(continuación)

Calcio

Anión	Catión/Anión- (mM)	Producto de Concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,5	anti-AB #1	92 %	83 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,0	anti-AB #1	89 %	88 %
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,5	anti-AB #1	88 %	91 %
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	7,3	anti-AB #1	68 %	84 %
Fosfato	50/33,3	1,7E-03	6,5-6,8	anti-AB #1	96 %	64 %
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	7,3	anti-GDF8 #1	90 %	91 %
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	8,9	anti-GDF8 #1	68 %	80 %
Sulfito*	50/33,3	1,7E-03	7,5	anti-GDF8 #1	46 %	94 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,3	anti-AB #1	96 %	96 %
Fosfato*	20/13,3	2,7E-04	7,2	anti-AB #1	78 %	94 %
Sulfito*	50/50	2,5E-03	7,6	anti-AB #1	56 %	91 %
Carbonato*	50/50	2,5E-03	8,7	anti-AB #1	79 %	95 %
Fluoruro*	50/10	5,0E-04	7,5	anti-AB #1	93 %	84 %
Silicato*	50/50	2,5E-03	9,2	anti-GDF8 #1	88 %	90 %
Molibdato*	50/50	2,5E-03	8,0	anti-GDF8 #1	30 %	95 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-AB #1	83 %	91 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-AB #2	93 %	100 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-GDF8 #1	80 %	99 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	93 %	94 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	92 %	93 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	94 %	97 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	89 %	96 %

ES 2 704 040 T3

(continuación)

Calcio

Anión	Catión/Anión- (mM)	Producto de Concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	93 %	94 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	95 %	96 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL22	97 %	100 %
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-AB #1	84 %	93 %
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-IL22	95 %	102 %
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-AB #1	83 %	95 %
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #1	93 %	94 %
Fosfato*	40/20	8,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #2	96 %	85 %
Fosfato*	80/20	1,6E-03	6,5-6,7	anti-AB #1	98 %	62 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-GDF8 #2	92 %	97 %
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL13 #1	98 %	97 %

Magnesio

Anión	Catión/ Anión- (mM)	Producto de concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Carbonato	200/133	2,7E-02	9	anti-AB #1	70 %	100 %
Fosfato	200/133	2,7E-02	8	anti-GDF8 #1	77 %	95 %
Fosfato	200/133	2,7E-02	9	anti-GDF8 #1	77 %	90 %
Fluoruro*	50/10	5,0E-04	7,4	anti-AB #1	97 %	89 %
Fosfato*	50/33,3	1,7E-03	8	anti-AB #1	54 %	91 %
Fosfato*	100/66, 7	6,7E-03	8	anti-AB #1	43 %	88 %

Manganeso (II)

Anión	Catión/ Anión- (mM)	Producto de concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	6,9	anti-AB #1	79 %	99 %
Carbonato	20/13,3	2,7E-04	7,4	anti-AB#1	59 %	96 %
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	7,2	anti-GDF8 #1	81 %	85 %

Cobalto (II)

Anión	Catión/ Anión- (mM)	Producto de concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,1	anti-AB #1	78 %	74 %

Nickel

Anión	Catión/ Anión- (mM)	Producto de concentraciones (M ²)	pH	mAb	% de reducción de la turbidez	% de recuperación del producto
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	8	anti-GDF8 #1	58 %	63 %
Carbonato	20/13,3	2,7E-04	8	anti-GDF8 #1	42 %	62 %

Se midieron los niveles residuales de calcio y fosfato en los sobrenadantes de algunas muestras. Los residuos de calcio se midieron usando un kit de análisis de calcio QuantiChrom™ BioAssay Systems (DICA-500). Los residuos de fosfato se midieron usando un kit de análisis de fosfato verde de malaquita BioAssay Systems (POMG-25H). En la muestra anti-IL13 # 2 con calcio 40 mM y fosfato 20 mM en la tabla 1, el sobrenadante después de la centrifugación contenía calcio 8,19 mM y fosfato 1,04 mM. Este nivel de calcio y fosfato solubles se traduce en una K_{sp} de $8,5 \times 10^{-6} M^2$. En la muestra anti-AB #1 con calcio 80 mM y fosfato 20 mM en la tabla 1, el sobrenadante después de la centrifugación contenía calcio 22,2 mM y fosfato 0,4 mM. Este nivel de calcio y fosfato solubles se traduce en una K_{sp} de $8,4 \times 10^{-6} M^2$.

10 Ejemplo 2

Efecto del orden de adición de anión/catión: se produjo un mAb, anti-GDF8 # 1 por células CHO recombinantes cultivadas en medio libre de suero. Aproximadamente 50 ml del medio acondicionado que contenía células se dividieron en alícuotas en matraces Erlenmeyer de 3 x 125 ml, A, B y C. La muestra A se dejó sin tratar y sirvió como control negativo. Se añadió HEPES a 40 mM para controlar el pH en las muestras B y C. Se añadió cloruro de calcio 5 M a la muestra B hasta una concentración de 50 mM; después de mezclar suavemente, se añadió sulfito de sodio 0,5 M a una concentración de 33,3 mM. Para la Muestra C, se invirtió el orden de adición. Se añadió sulfito de sodio 0,5 M a una concentración de 33,3 mM; después de mezclar suavemente, se añadió cloruro de calcio 5M a una concentración de 50 mM. Las tres mezclas tuvieron pH entre 7,4 y 7,6. Las mezclas se dejaron incubar en un agitador durante una hora a 18-25 °C. Después de la incubación, las mezclas se vertieron en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada mezcla se centrifugó a 340 g durante diez minutos. El sobrenadante clarificado se eliminó y se analizó para determinar la concentración de anticuerpos mediante HPLC con Proteína A y para determinar la turbidez usando un nefalómetro.

Las muestras B y C tuvieron recuperaciones de anticuerpos del 94 % en comparación con la muestra no tratada. La muestra B, con el catión añadido primero, mostró un aumento de la turbidez en comparación con la muestra no tratada, lo que indica que se había formado un precipitado, pero que era demasiado pequeño para eliminarse fácilmente mediante centrifugación. La muestra C, con el anión añadido primero, mostró una reducción del 46 % en la turbidez en comparación con la muestra no tratada, lo que indica que el precipitado que se formó fue lo suficientemente grande como para ser expulsado fácilmente por centrifugación. La reducción de la turbidez también

indica que cierta cantidad de residuos celulares y/o material coloidal se unieron por el precipitado y se eliminaron en las pellas.

Ejemplo 3

5 Un experimento a escala piloto que usa calcio y fosfato como precipitantes y los efectos en las etapas de clarificación y cromatografía posteriores: un mAb, anti-AB #1, fue producido por células CHO recombinantes cultivadas en medio libre de suero en un biorreactor de 500 l. En el momento de la recolección, el cultivo se llevó a temperatura ambiente (18-25 °C). 350 l de cultivo se dejaron sin tratar y sirvieron como control negativo. Se transfirieron 150 l del cultivo a una bombona de 200 l y se mezclaron lentamente con un mezclador superior. Se añadió una solución reguladora a 40 mM para controlar el pH. Luego se añadió fosfato de potasio 2M a una concentración de 20 mM. Luego se añadió cloruro de calcio 5 M a una concentración de 30 mM. El pH de la mezcla fue de 7,3. El cultivo floculado se incubó durante 160 minutos mientras se mezclaba. Al final de la incubación, el pH de la mezcla fue de 7,0.

15 Tanto los cultivos floculados como los no tratados se procesaron a través de una centrifuga apiladora de discos Alfa Laval BTPX 205 a una velocidad de flujo de 4,4 l/min y una velocidad de la taza de 7630 RPM (8000 g). La turbidez centrada en estado estable de la muestra floculada fue de 14 NTU, en comparación con 117 NTU para la muestra no tratada, una reducción del 88 % en la turbidez. La recuperación del título de anticuerpos en el centrifugado floculado fue del 96 % en comparación con el centrifugado no tratado. El nivel de proteínas de la célula huésped (HCP) en el centrifugado floculado se redujo en un 35 % de 533,341 ppm a 348,087 ppm en comparación con el centrifugado sin tratar.

20 Tanto los centrifugados floculados como los no tratados se procesaron a través de filtros de almohadilla Millipore AIHC a una capacidad de 250 l de centrifugado por metro cuadrado de filtro. La muestra no tratada mostró un avance cada vez mayor de la turbidez, desde 4 NTU a 24 l/m² a 26 NTU a 121 l/m² a 37 NTU a 254 l/m². La turbidez de la mezcla de filtrado de la almohadilla final para la muestra no tratada fue de 21 NTU. La muestra floculada mostró solo un pequeño aumento en la turbidez a través de las almohadillas, desde 2 NTU a 21 l/m² a 6 NTU a 150 l/m² a 7 NTU a 254 l/m². La turbidez de la mezcla de filtrado de la almohadilla final para la muestra floculada fue de 5 NTU, una reducción de la turbidez del 76 % en comparación con la muestra no tratada.

25 Después de la filtración de la almohadilla y la filtración adicional a través de un filtro de pulido de 0,2 µm, las muestras se sometieron a cromatografía usando una columna de afinidad de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Cuando los anticuerpos se eluyen a partir de las columnas de Proteína A, las mezclas de picos a menudo son turbias, y esa turbidez por lo general aumenta cuando se neutraliza el pico. La mezcla de picos sin tratar tenía una turbidez de 10 NTU y aumentó a 22 NTU tras la neutralización. La mezcla de picos floculados tenía una turbidez de 3 NTU y aumentó a 8 NTU después de la neutralización, un 63 % más bajo que el pico sin tratar.

Ejemplo 4

35 La floculación con calcio y fosfato dio como resultado una turbidez reducida tanto en el medio acondicionado clarificado como en el pico de Proteína A. También se logró una reducción significativa de una impureza relacionada tanto con la célula como con el producto.

40 Se produjo un mAb, anti-5T4, por células CHO recombinantes cultivadas en medio libre de suero. Aproximadamente 3 l de cultivo se dejaron sin tratar y sirvieron como control negativo. Se transfirieron otros 3 l del cultivo a un recipiente de 4 l. Se añadió una solución reguladora a 40 mM para controlar el pH y se mezcló suavemente a 18-24 °C. Luego se añadió fosfato de potasio 2M a una concentración de 20 mM y la solución se mezcló suavemente. Luego se añadió cloruro de calcio 5 M a una concentración de 30 mM y la solución se mezcló suavemente. El pH de la mezcla fue de 7.2. El cultivo floculado se transfirió a tres matraces Erlenmeyer de 2l y se incubó durante 2 horas mientras se mezclaba. Al final de la incubación, el pH de la mezcla fue de 7,0.

45 Una muestra de 50 ml tanto del cultivo floculado como del cultivo no tratado se centrifugó a 340 g durante diez minutos. El sobrenadante clarificado se eliminó y se analizó para determinar la concentración de anticuerpos mediante HPLC con Proteína A y para determinar la turbidez usando un nefalómetro. La recuperación total del material relacionado con el producto fue del 78 % en comparación con la muestra no tratada. La turbidez de la muestra no tratada fue de 29 NTU. La turbidez de la muestra floculada fue de 2 NTU, una reducción del 93 % en la turbidez en comparación con la muestra no tratada.

50 Tanto las muestras floculadas como las no tratadas se procesaron a través de filtros de almohadilla Millipore AIHC. Después de la filtración de la almohadilla y la filtración adicional a través de un filtro de pulido de 0,2 µm, las muestras se sometieron a cromatografía usando una columna de afinidad de Proteína A GE Healthcare MabSelect. A medida que los anticuerpos se eluyen a partir de las columnas de Proteína A en altas concentraciones, el material en el vértice máximo del producto a menudo precipita, dando como resultado una solución turbia. El nivel de precipitación en el vértice máximo de la muestra no tratada, medido por la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro, fue de 1,85 AU. El nivel de precipitación en el vértice máximo de la muestra floculada, medido

55

por la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro, fue de 0.03 AU, una reducción de la turbidez del 98 % en comparación con la muestra no tratada.

5 Cuando los anticuerpos se eluyen a partir de las columnas de Proteína A, las mezclas de picos son ocasionalmente turbias. Tras la neutralización, la turbidez por lo general aumenta significativamente entre pH 5,5 y pH 6,0, a medida que el material precipita y cae fuera de la solución. Parte de este precipitado tiende a volverse soluble nuevamente a medida que el pH se eleva por encima de 7. La mezcla de picos sin tratar, con una concentración de anticuerpo de 8,1 mg/ml tuvo una turbidez de 8,5 NTU cuando se eluyó, aumentó a 839 NTU entre pH 5,5 y 6,0. y disminuyó a 53 NTU a pH 7,0. Tras la filtración a través de un filtro de grado de esterilización de 0,2 μm , la turbidez solo se redujo a 40 NTU.

10 La mezcla de productos floculados se eluyó a partir de la columna en menos volumen y, por lo tanto, estaba más concentrado. La mezcla de picos floculados, con una concentración de anticuerpo de 15,1 mg/ml, tuvo una turbidez de 5,6 NTU cuando se eluyó, aumentó a 31 NTU entre pH 5,5 y 6,0, una reducción del 96 % en la turbidez del control. La turbidez aumentó ligeramente a 46 NTU a pH 7,0 a 15,1 mg/ml. Tras la filtración a través de un filtro de grado de esterilización de 0,2 μm , la turbidez se redujo a 8,1 NTU, una reducción del 80 % del control.

15 Cuando el pico de Proteína A neutralizada se diluyó a una concentración de 8,1 mg/ml para igualar la muestra no tratada, la turbidez de la muestra floculada no filtrada disminuyó de 46 NTU a 25 NTU, una reducción del 53 % en comparación con la muestra no tratada. Tras la filtración a través de un filtro de grado de esterilización de 0,2 μm , la turbidez se redujo a 4,1 NTU, una reducción del 90 % en la turbidez en comparación con la muestra no tratada.

20 El nivel de agregado de alto peso molecular (HMM) presente en la mezcla de picos de Proteína A se midió por HPLC de exclusión por tamaño. El nivel de agregados en la muestra no tratada fue de 9,51 %. El nivel de agregado en la muestra floculada fue de 1,05 %, una reducción del 89 % en el agregado en comparación con la muestra no tratada. Teniendo en cuenta la reducción del agregado, la recuperación del 78 % del producto en el cultivo se traduce en una recuperación del 85 % del monómero deseado.

25 Los niveles de proteínas de la célula huésped (HCP), impurezas no deseadas secretadas por las células CHO, se midieron en diferentes etapas del proceso usando un ELISA. Los niveles de HCP se informan como partes por millón (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticuerpo. El nivel de HCP en el cultivo no tratado fue de 2,53E6 ppm. El nivel de HCP en el medio acondicionado floculado fue de 3,83E5 ppm, una reducción del 84 % en comparación con el cultivo no tratado. Tanto los cultivos sin tratar como los cultivos floculados tuvieron una reducción de aproximadamente el 60 % en HCP a través de los filtros de almohadilla a 1,02E6 y 1,62E5 respectivamente. Tras la purificación sobre la columna de Proteína A, los niveles de HCP en la muestra no tratada se redujeron en un 90 % a 1,03E5 ppm. Los niveles de HCP en la muestra floculada se redujeron en un 98 % a 3,83E2 ppm. En general, hubo una eliminación de 1,4 log de HCP para el tren de purificación no tratado. El tren de purificación floculado logró una eliminación de 3,8 log de HCP, lo que resultó en una reducción de 250 veces en HCP en comparación con el tren de purificación sin tratar.

35 Aunque se han descrito varias implementaciones, la invención no está tan limitada.

Como ejemplo, en algunas implementaciones, los procedimientos de floculación descritos en este documento pueden realizarse sin células presentes, por ejemplo, después de que las células hayan sido eliminadas. El medio puede contener material insoluble no celular (véase el ejemplo 5 a continuación).

Ejemplo 5

40 El uso de calcio y fosfato para formar un precipitado sólido para ayudar en la filtración de una solución que contiene proteína turbia: un mAb, anti-GDF8 # 1, fue producido por células CHO recombinantes cultivadas en medio libre de suero. Las células se extrajeron con una centrifuga apiladora de discos Alfa Laval BTPX 205 y el centrifugado resultante se procesó a través de filtros de almohadilla Millipore AIHC. Después de la filtración de la almohadilla y la filtración adicional a través de un filtro de pulido de 0,2 μm , las muestras se sometieron a cromatografía usando una columna de afinidad de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Cuando los anticuerpos se eluyen de las columnas de Proteína A, usando una solución reguladora de pH bajo, las mezclas de picos son ocasionalmente turbias. Tras la neutralización, la turbidez por lo general aumenta significativamente.

50 En este ejemplo, el pico de Proteína A se mantuvo sin filtrar durante 7 días a 4 °C y luego se calentó a temperatura ambiente. La turbidez del pico fue de 192 NTU. El pico se dividió en dos muestras de 800 ml, con una muestra sin tratar. A la segunda muestra se le añadió fosfato de potasio 4 mM y cloruro de calcio 6 mM. La muestra tratada se agitó luego en un matraz Erlenmeyer de 2 l, durante 1 hora a 18-25 °C. Después de agitar, la turbidez de la muestra tratada fue de 460 NTU.

55 Tanto las muestras no tratadas como las tratadas se filtraron luego a través de 17,7 cm² filtros de cápsula de polietersulfona de 0,5/0,2 μm Millipore Express SHC. En base a la cantidad de solución que pudo pasar a través de cada filtro, se calculó una capacidad máxima de filtro. La capacidad máxima del filtro es el número de litros de solución que pueden pasar a través de 1 m² de filtro antes de que el filtro se conecte y ya no puede pasar más

solución. La muestra no tratada pudo alcanzar una capacidad de filtro máxima de aproximadamente 30 l/m², mientras que la muestra tratada alcanzó una capacidad de filtro máxima de aproximadamente 1500 l/m², un aumento de 50 veces en la capacidad del filtro. La turbidez posterior al filtro tanto para las muestras no tratadas como para las tratadas fue de 9 NTU, lo que indica que el tratamiento probablemente no provocó la eliminación de material de partículas adicionales, sino que sirvió como ayuda para el filtro y permitió que grandes volúmenes de solución pasaran a través del filtro antes de conectarlo.

Ejemplo 6

El efecto de la escala y el procedimiento de mezcla sobre el uso de calcio y fosfato para formar un precipitado sólido para ayudar a la eliminación de partículas en una solución turbia que contiene proteínas: mAb Anti-AB # 2, señalado como "mAb B" en las figuras 2 y 3, fue producido por células CHO recombinantes cultivadas en medios libres de suero en biorreactores a escala piloto (160-500 l de cultivo de células). Aproximadamente 125 l, 1,5 l o 50 ml de los medios condicionados que contenían células se dividieron en partes alícuotas en una bombona de 200 l, un vaso de precipitados de 2 l o un matraz Erlenmeyer de 125 ml, respectivamente. Se añadió HEPES a 40 mM para controlar el pH. La bombona de 200 l y el vaso de precipitados de 2 l se mezclaron con los impulsores. El Erlenmeyer de 125 ml se mezcló con un agitador. Se añadió una solución concentrada de fosfato de potasio a cada mezcla para lograr una concentración final de 20 mM en la solución final. Se añadió una solución concentrada de cloruro de calcio a cada solución para lograr una concentración diana final de 30 mM y se mezcló. Los pH finales estuvieron entre 7,0 y 7,5. El sólido y el medio se incubaron durante más de una hora en condiciones de mezcla a temperatura ambiente (20-23 °C). Se centrifugaron alícuotas de 50 ml de una muestra no tratada, y las muestras tratadas con 125 l, 1,5 l y 50 ml se centrifugaron durante 10 minutos a 340 xg. Se midieron la turbidez y las concentraciones de anticuerpos en los sobrenadantes.

El efecto sobre la turbidez de la escala y el procedimiento de mezcla se muestra en la figura 2. La turbidez se reduce en más del 90 % del control en todos los ejemplos de floculación independientes de la escala e independientes del procedimiento de mezcla (impulsor o agitador). Además, la recuperación de anticuerpos en todas las muestras tratadas fue del 100 % en comparación con la muestra no tratada. De este modo, no parece que la floculación en la presente invención dependa de la escala o del procedimiento de mezcla para estas condiciones muy diferentes.

Los niveles de proteínas de la célula huésped (HCP), impurezas no deseadas secretadas por las células CHO, se midieron en el sobrenadante no tratado y la muestra tratada de 125 l usando un ELISA. Los niveles de HCP se informan como partes por millón (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticuerpo. La muestra tratada de 125 l tuvo una reducción en HCP del 50 % en comparación con la muestra no tratada.

Ejemplo 7

El efecto de la velocidad de mezcla en el uso de calcio y fosfato para formar un precipitado sólido para ayudar a la eliminación de partículas en una solución turbia que contiene proteínas: mAb Anti-AB # 2, señalado como "mAb B" en la figura 3, fue producido por células CHO recombinantes cultivadas en medios libres de suero en biorreactores a escala piloto (160-500 l de cultivo de células). Aproximadamente 125 l de los medios condicionados que contenían células se colocaron en dos bombonas de 200 l. Se añadió HEPES a 40 mM para controlar el pH. La mezcla se realizó con impulsores, uno operado a una velocidad de punta de 0.9 m/s y el otro a 2,5 m/s. Se añadió una solución concentrada de fosfato de potasio a la mezcla para lograr una concentración final de 20 mM en la solución final. Se añadió una solución concentrada de cloruro de calcio a la solución para lograr una concentración diana final de 30 mM y se mezcló. El pH final estuvo entre 7,0 y 7,5. El sólido y el medio se incubaron en condiciones de mezcla a temperatura ambiente (20-23 °C) y las muestras se tomaron en diversos puntos de tiempo. La turbidez de cada muestra sobrenadante se midió después de centrifugar a 340 xg durante diez minutos. El efecto sobre la turbidez de la velocidad de punta del impulsor se muestra en la figura 3. La turbidez se reduce en más del 90 % del control en todos los ejemplos de floculación independientes de las velocidades de punta investigadas después de una hora. La velocidad de punta más rápida parecía tener una reducción más rápida de la turbidez en el punto de tiempo de 15 minutos. Sin embargo, esta diferencia no es significativa. De este modo, no parece que la floculación en la presente invención dependa de la velocidad de punta para las velocidades investigadas después de una hora de incubación.

Los niveles de proteínas de la célula huésped (HCP), impurezas no deseadas producidas por las células CHO, se midieron en el sobrenadante no tratado y la muestra tratada de 0,9 m/s usando un ELISA. Los niveles de HCP se informan como partes por millón (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticuerpo. La muestra tratada tuvo una reducción en HCP del 47 % en comparación con la muestra no tratada.

Ejemplo 8

Floculación a gran escala:

Un experimento a escala piloto que usa calcio y fosfato como precipitantes y los efectos en las etapas de clarificación y cromatografía posteriores: se produjo un mAb, anti-IL-13 # 1 (señalado como mAb E en las figuras 4 y 5), en cinco lotes diferentes de células CHO recombinantes cultivadas en medio libre de suero en un biorreactor de 190 l. El biorreactor se realizó con un tiempo de cultivo de 12-14 días, y las células tenían una viabilidad entre 8x10⁶ - 11x10⁶ células viables/ml, y eran viables en un 66-88 %. En el momento de la recolección, el cultivo se llevó a

5 temperatura ambiente (18-25 °C). Se transfirieron 150 l del cultivo a una bomba de 200 l (para los primeros cuatro lotes) o se dejaron en el biorreactor (para el último lote) y se mezclaron lentamente con un mezclador superior. Se añadió solución reguladora HEPES a 40 mM para controlar el pH. Luego se añadió fosfato de potasio 2M a una concentración de 20 mM. Luego se añadió cloruro de calcio 5 M a una concentración de 30 mM. El pH de la mezcla estuvo entre 7 y 7,5. El cultivo floculado se incubó entre 2 y 3 horas mientras se mezclaba.

10 Los cultivos floculados se procesaron a través de una centrífuga apiladora de discos Alfa Laval BTPX 205 a una velocidad de flujo entre 4 y 5 l/min y una velocidad de la cuba de 7630 RPM (8000 g). La turbidez de los centrifugados obtenidos se compara con el sobrenadante de la muestra no floculada (obtenida de la centrifugación del control no tratado a 340 g durante diez minutos) en la figura 4. En todos los casos, la floculación reduce la turbidez en más del 85 %. La recuperación del título de anticuerpos en los sobrenadantes floculados se muestra en la figura 5 en función del tiempo de incubación, y está por encima del 75 % en todos los casos. Se tomaron muestras de 50 ml de los lotes 403 y 405 y se incubaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml durante un tiempo adicional. Después de 7 horas, el lote 403 tenía un título del 60 % de la muestra no tratada, y el lote 405 tenía un título del 80 % de la muestra no tratada.

15 Los niveles de proteínas de la célula huésped (HCP), impurezas no deseadas secretadas por las células CHO, se midieron en los sobrenadantes no tratados y se trataron los centrifugados usando un ELISA. Los niveles de HCP se informan como partes por millón (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticuerpo. Las muestras tratadas de los 5 lotes mostraron reducciones en HCP del 49 %-69 % en comparación con las muestras no tratadas.

20 Los primeros 3 lotes se procesaron a través de filtros de almohadilla Millipore A1HC a una capacidad de 270 l de centrifugado por metro cuadrado de filtro a un flujo de 120 litros por metro cuadrado por hora sin aumento de presión o turbidez.

Después de la filtración de la almohadilla, las muestras generalmente permanecieron estables durante muchos días según lo medido por turbidez.

25 Los últimos 2 lotes pasaron directamente por los filtros de 0,2 µm sin pasar por las almohadillas. Se lograron capacidades de filtro de 730 y 160 l/m², respectivamente, sin el uso de filtros de almohadilla antes de los filtros de 0,2 µm. Estas capacidades de filtro representan una mejora significativa en la capacidad de filtrado sobre la del material no disuelto. Al mantener los centrifugados filtrados de 0,2 µm (sin almohadillas) a temperatura ambiente (18-24 °C), la turbidez comienza a aumentar en unas pocas horas debido a la continua precipitación del calcio y el fosfato. Después de 24-48 horas, el precipitado se sedimenta, formando una capa cristalina de fosfato de calcio en el fondo del recipiente. La solución que contiene proteína clarificada resultante tiene excelentes características de capacidad de filtrado antes y después de que se sedimente el precipitado. No se pierde ningún anticuerpo en el precipitado.

30 La floculación para el lote final se realizó directamente en el biorreactor piloto. El reactor se limpió de manera eficaz usando procedimientos estándar de limpieza in situ (CIP) (enjuague con agua seguido de un lavado con NaOH 0,1N a 60-80 °C)

35 Los 5 lotes se procesaron a escala piloto a través de una columna de Proteína A, una etapa de intercambio aniónico, un filtro de retención de virus y una ultrafiltración/diafiltración final (UF/DF) sin problemas operacionales. Los picos de proteína A neutralizados tenían turbidez de <20 NTU y eran altamente filtrables. La calidad del producto, tal como los niveles de agregados de alto peso molecular y los clips de bajo peso molecular, medidos por HPLC de exclusión por tamaño y electroforesis en gel SDS-PAGE, y los niveles de especies ácidas y básicas, medidos por HPLC de intercambio catiónico, fueron comparables a una anterior campaña piloto no floculada con este anticuerpo.

Ejemplo 9

45 El uso de calcio y fosfato como precipitantes y los efectos en una etapa de cromatografía de Proteína A posterior y la siguiente filtración: se produjeron tres mAbs, anti-AB #2, anti-GDF8 #1, y anti-IL22 por células CHO recombinantes cultivadas en medios libres de suero. Para cada uno, los cultivos se dividieron por la mitad, dejando la primera muestra sin tratar. A la segunda muestra (la muestra tratada) se le añadió HEPES a un nivel de 40 mM, fosfato de potasio a un nivel de 20 mM y cloruro de calcio a un nivel de 30 mM. Las células de todas las muestras se eliminaron mediante centrifugación y los sobrenadantes resultantes se procesaron a través de filtros de almohadilla Millipore A1HC. Después de la filtración de la almohadilla y la filtración adicional a través de filtros de pulido de 0,2 µm, las muestras se sometieron a cromatografía usando columnas de afinidad de proteína A de GE Healthcare MabSelect. Cuando los anticuerpos se eluyen de las columnas de Proteína A, usando una solución reguladora de pH bajo, las mezclas de picos son ocasionalmente turbios. Tras la neutralización, la turbidez por lo general aumenta significativamente.

50 La turbidez máxima neutralizada de las muestras no tratadas y tratadas se muestran en la tabla 2 a continuación. Las tres muestras tratadas mostraron una reducción significativa en la turbidez máxima neutralizada en comparación con las muestras no tratadas.

Tabla 2: Disminución de la turbidez máxima de la proteína A después del tratamiento con fosfato de calcio del cultivo celular antes de cargar

	Turbidez máxima de la muestra no tratada (NTU)	Turbidez máxima de la muestra tratada (NTU)	% de reducción en la turbidez de la muestra no tratada a tratada
anti-AB #2	61	25	60 %
anti-GDF8 #1	153	25	84 %
anti-IL22	233	12	95 %

5 Las máximas neutralizadas con anti-IL22 tanto sin tratar como tratadas se filtraron luego a través de filtros de jeringa de polietersulfona de 0,8/0,2 μm de Pall Acrodisc Supor de 2,8 cm^2 . En base a la cantidad de solución que pudo pasar a través de cada filtro, se calculó una capacidad máxima de filtro. La capacidad máxima del filtro es el número de litros de solución que pueden pasar a través de 1 m^2 de filtro antes de que el filtro se conecte y ya no puede pasar más solución. La muestra no tratada pudo alcanzar una capacidad de filtro máxima de aproximadamente 10-30 l/m^2 . 170 l/m^2 de la muestra tratada pasaron a través del filtro sin una reducción en el flujo, momento en el que no quedó ninguna muestra tratada. La muestra tratada pasó a través del filtro demasiado rápido para calcular con precisión la capacidad máxima del filtro. Sin embargo, como no hubo una reducción en el flujo hacia un desafío de 10 170 l/m^2 , se puede suponer que la capacidad máxima habría sido significativamente mayor que 170 l/m^2 .

Otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de separación que comprende:
 - introducción de una primera sal soluble que comprende un primer catión y una segunda sal soluble que comprende un primer anión en un medio que comprende una proteína diana e impurezas,
 - 5 - opcionalmente, titulación del medio al pH apropiado y/o ajuste de la temperatura del medio,
 - incubación para permitir la formación de un precipitado que comprende el primer catión, el primer anión y una impureza,
 - y separación del precipitado de dicha proteína diana.
- en el que la primera y segunda sales solubles son diferentes y
- 10 - el primer catión se selecciona entre Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn(II) , Co(II) , o Ni^{2+} ,
- el primer anión se selecciona entre fosfato, sulfito, carbonato, fluoruro, molibdato o silicato.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer catión y el primer anión se introducen secuencialmente.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer catión y el primer anión se introducen simultáneamente.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el precipitado tiene una constante de producto de solubilidad de no más de 10^{-4}M^2 .
5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la introducción de 4 mM a 200 mM del primer catión o el primer anión en el medio.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de las concentraciones del primer catión y el primer anión es mayor que 10^{-5}M^2 .
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de las concentraciones del primer catión y el primer anión es mayor que 10^{-4}M^2 .
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el producto de las concentraciones del primer catión y el primer anión es mayor que $2,7 \times 10^{-2}\text{M}^2$.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende introducir diferentes concentraciones del primer catión y el primer anión en el medio.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende introducir la misma concentración del primer catión y el primer anión en el medio.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH del medio se mantiene entre 5 y 9.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se separa al menos el 50 % de la proteína en el medio.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se separa al menos el 70 % de la proteína en el medio.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además disminuir la turbidez del medio clarificado en al menos un 30 % con respecto a un segundo medio clarificado idéntico al medio y libre del precipitado.
- 35 15. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además disminuir la turbidez del medio clarificado en al menos un 50 % con respecto a un segundo medio clarificado idéntico al medio y libre del precipitado.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio comprende además células de mamífero.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio comprende además células eucariotas.
- 40 18. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además centrifugar el medio, filtrar el medio a través de un dispositivo de microfiltración o filtrar el medio a través de un filtro de profundidad.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el precipitado comprende además un segundo catión o un segundo anión.

20. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio que comprende la proteína, después de que se forma y se separa el precipitado, se aplica a una columna de Proteína A y se eluye para proporcionar un pico eluido que tiene una turbidez más baja que un pico eluido de forma similar de un segundo medio idéntico al primer medio y libre de formación del precipitado.
- 5 21. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio que comprende la proteína, después de que se forma y se separa el precipitado, se aplica a una columna de Proteína A y se eluye para proporcionar un pico eluido que tiene un nivel de impurezas solubles más bajo que un pico eluido de un segundo medio idéntico al medio y libre de formación del precipitado.
22. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína secretada.
- 10 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un receptor soluble, una fusión de receptores, una citoquina, un factor de crecimiento, una enzima y un factor de coagulación.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un péptido A β , interleuquina-13, interleuquina-22, 5T4, o factor de crecimiento y diferenciación-8.

FIG. 1

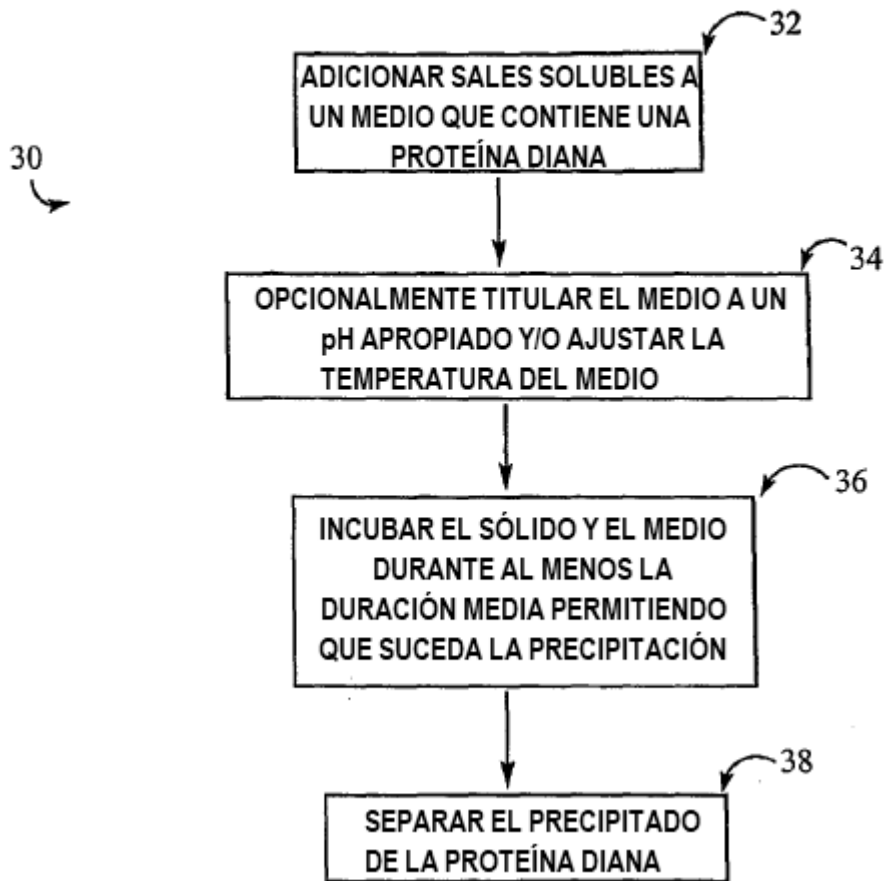


FIG. 2

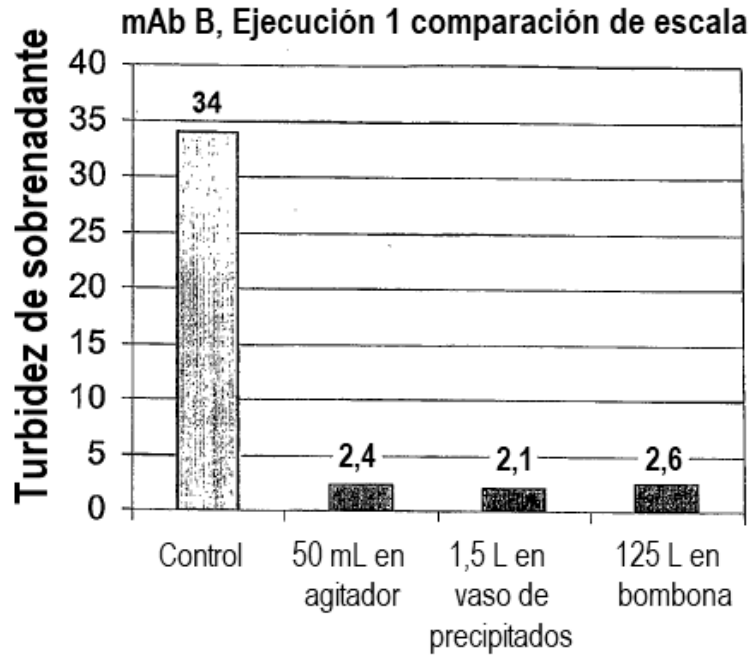


FIG. 3

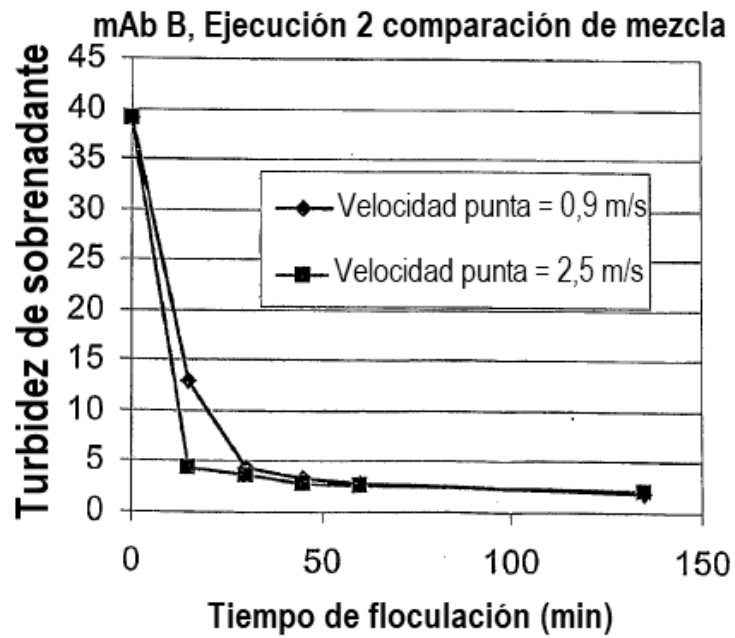


FIG. 4

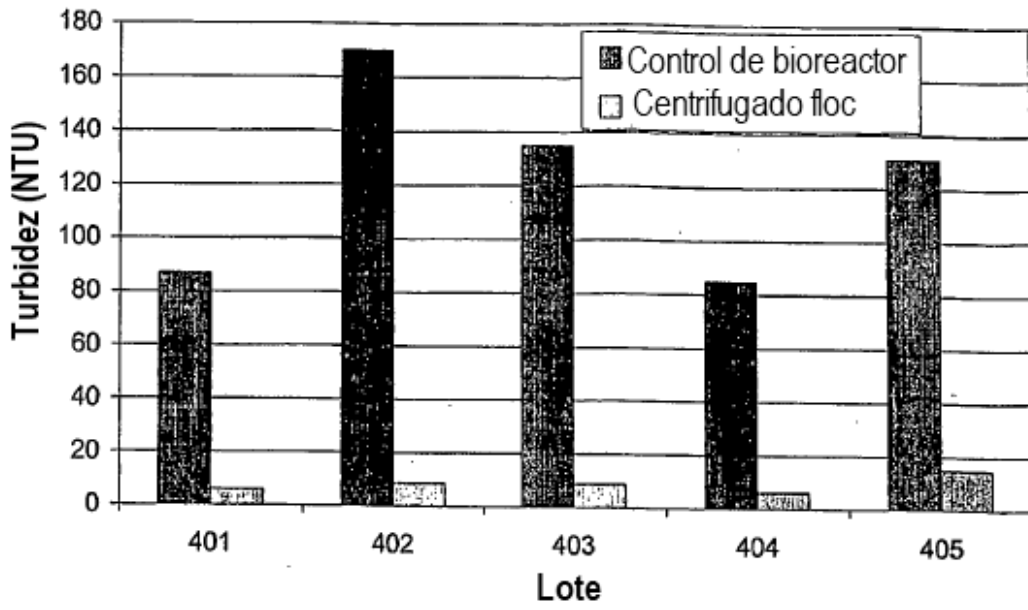


FIG. 5

