

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 135**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/IB2012/003028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12842689 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2768857**

54 Título: **Métodos para purificar anticuerpos**

30 Prioridad:

19.10.2011 US 201161548958 P

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

16.06.2020

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. des Aulx 1228 Plan-Les-Ouates
Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**ELSON, GREG;
FOUQUE, NICOLAS;
DEPOISIER, JEAN-FRANCOIS;
FISCHER, NICOLAS y
MAGISTRELLI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 767 135 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

Métodos para purificar anticuerpos

5 Campo de la invención

La descripción proporciona los métodos para purificar anticuerpos mediante el uso de diversos medios de afinidad específicos de anticuerpos para separar rápida y eficientemente las mezclas de anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y/o los componentes de anticuerpos para aislar un producto de anticuerpo deseado de la mezcla. La invención se refiere a la purificación de anticuerpos monoclonales biespecíficos que tienen una especificidad diferente para cada sitio de unión de la molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, los anticuerpos compuestos de una sola cadena pesada y dos cadenas ligeras diferentes, una que contiene un dominio constante Kappa y la otra un dominio constante Lambda, que incluyen anticuerpos de diferentes especificidades que comparten un cadena pesada común. La descripción proporciona además los métodos para purificar eficientemente anticuerpos intactos mediante la separación del anticuerpo intacto de las cadenas ligeras libres producidas durante el proceso de expresión de anticuerpos en cultivo celular.

Antecedentes de la invención

20 Un anticuerpo está compuesto por cuatro polipéptidos: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La porción de unión al antígeno de un anticuerpo se forma por el dominio variable de la cadena ligera (VL) y el dominio variable de la cadena pesada (VH). En un extremo de estos dominios seis lazos forman el sitio de unión al antígeno y también se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las tres CDR se localizan en el dominio VH (H1, H2 y H3) y los otros tres en el dominio VL (L1, L2 y L3).

25 La gran mayoría de las inmunoglobulinas son moléculas bivalentes y mono-específicas que tienen la misma especificidad sobre ambos brazos, ya que están compuestas por dos polipéptidos de cadena pesada idénticos y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos.

30 Los anticuerpos monoclonales surgen como una clase exitosa y atractiva de moléculas para la intervención terapéutica en diversas áreas de enfermedad de los seres humanos. Sin embargo, seleccionar o neutralizar una sola proteína no siempre es suficiente para lograr la eficacia en ciertas enfermedades lo que limita el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales. Cada vez está más claro que en una serie de indicaciones, neutralizar un componente de un sistema biológico no es suficiente para lograr la eficiencia. Una solución a este problema es la administración conjunta de diversos anticuerpos monoclonales.

35 Sin embargo este enfoque es complicado por los aspectos regulatorios si los anticuerpos a combinar no se han aprobado de forma individual previamente. Además, los enfoques de combinación también son costosos desde una perspectiva de fabricación. En consecuencia, existe la necesidad de anticuerpos y terapias que faciliten el direccionamiento de múltiples antígenos con una sola molécula, así como también la necesidad de purificar y aislar eficientemente estos anticuerpos multiespecíficos. También existe la necesidad de purificar y aislar eficientemente anticuerpos intactos de mezclas que contienen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o componentes de anticuerpos. Gupta Seema y otros J. of Biochem and Biophysical Methods, 51:3, páginas 203-216 (2002) describen un método para purificar anticuerpos intactos o una combinación de anticuerpos intactos de una mezcla. Husereau D R y otros J. of Immunological Methods, Elsevier Science Publishers, 429:1-2, páginas 33-41 (2001) describen un método de afinidad general para purificar anticuerpos etiquetados con peroxidasa. Ford, C H, y otros J. of Chromatography B: Biomedical Applications, 754:2, páginas 427-435 (2001) describen la purificación por afinidad de nuevos anticuerpos biespecíficos que reconocen el antígeno carcinoembrionario y la doxorubicina.

Resumen de la invención

50 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La descripción proporciona una variedad de técnicas que usan los medios de purificación específicos de anticuerpos y los reactivos relacionados para separar y aislar un producto de anticuerpo deseado o una combinación de productos de anticuerpo deseados de una mezcla de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, componentes de anticuerpos tales como cadenas ligeras libres y combinaciones de los mismos. Los métodos proporcionados en la presente descripción separan rápida y eficientemente un producto de anticuerpo deseado o una combinación de productos de anticuerpo deseados de una mezcla de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, en algunas modalidades, el método está diseñado para aislar un anticuerpo intacto o una combinación de anticuerpos intactos de componentes de anticuerpos tales como cadenas ligeras libres, que son subproductos del proceso de fabricación de anticuerpos. Como se usa en la presente descripción, el término molécula de anticuerpo "intacto" significa un anticuerpo de longitud completa, lo contrario a un fragmento y/o otra porción de un anticuerpo de longitud completa, que se denominan colectivamente en la presente descripción un anticuerpo "no intacto". El anticuerpo intacto puede ser cualquier anticuerpo intacto, incluidos a modo de un ejemplo no limitante, anticuerpos monovalentes intactos, anticuerpos biespecíficos intactos, anticuerpos multiespecíficos intactos, anticuerpos monoclonales intactos, tales como anticuerpos completamente humanos intactos, anticuerpos humanizados intactos y/o otros anticuerpos quiméricos intactos. El método de la invención está diseñado para

aislar un anticuerpo biespecífico, tal como, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que tienen una sola cadena pesada y al menos una región de cadena ligera kappa (κ) (o región de cadena ligera derivada de una cadena ligera κ) y al menos una región de cadena ligera lambda (λ) (o una región de cadena ligera derivada de una cadena ligera λ).

5 El medio de purificación es, en algunas modalidades, un medio de afinidad, por ejemplo, una resina u otro medio de separación que es específico para las cadenas ligeras κ y porciones de las mismas, tal como la resina KappaSelect y/o una resina que contiene proteínas L, que aíslan anticuerpos y fragmentos de estos que contienen una cadena ligera κ (o una porción de esta). El medio de purificación es, en algunas modalidades, un medio de afinidad, por ejemplo, una resina u otro medio de separación que es específico para las cadenas ligeras λ . y porciones de las mismas, tal como la resina LambdaFabSelect, que aísla anticuerpos y fragmentos de estos que contienen una cadena ligera λ (o una porción de esta). El medio de purificación es, por ejemplo, un agente de cromatografía en modo mixto tal como el sorbente de cromatografía Mep HyperCel™, que aísla los anticuerpos IgG intactos de los fragmentos de anticuerpos y otros componentes de anticuerpos, incluidas las cadenas ligeras libres. El medio de purificación es, en algunas modalidades, una combinación de uno o más de estos medios.

15 En un aspecto, la descripción permite la purificación de los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que no pueden distinguirse en la secuencia de los anticuerpos estándar. La naturaleza no modificada de los anticuerpos purificados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos les proporciona características de fabricación favorables de manera similar a los anticuerpos monoclonales estándar.

20 Los métodos proporcionados en la presente descripción es útil para purificar una variedad de anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, particularmente los anticuerpos biespecíficos a los que se hace referencia en la presente descripción como "κλ-cuerpos" y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que tienen una cadena pesada de IgG común y dos cadenas ligeras diferentes, una que tiene una región constante kappa (κ) y la otra que tiene una región constante lambda (λ), que dirigen su especificidad a dos dianas independientemente.

30 Los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos a purificar pueden generarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de métodos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden generarse mediante (i) el aislamiento de dos anticuerpos que tienen especificidades diferentes y que comparten el mismo dominio de cadena pesada variable pero diferentes cadenas ligeras variables, por ejemplo mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos que tienen una cadena pesada fija o animales transgénicos que contienen un solo gen de VH; (ii) fusionar el dominio de cadena pesada variable a la región constante de una cadena pesada, fusionar un dominio variable de cadena ligera a un dominio constante Kappa, y fusionar el otro dominio variable de cadena ligera a un dominio constante Lambda; y (iii) coexpresar las tres cadenas en una célula huésped o línea celular, por ejemplo, células de mamífero y/o líneas celulares de mamífero, lo que conduce al ensamblaje y secreción en el sobrenadante de una mezcla de tres anticuerpos: dos anticuerpos monoespecíficos y un anticuerpo biespecífico que porta dos cadenas ligeras diferentes. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, al menos una primera porción de la primera cadena ligera es del tipo Kappa y al menos una porción de la segunda cadena ligera es del tipo Lambda. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la primera cadena ligera incluye al menos una región constante Kappa. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la primera cadena ligera incluye también una región variable Kappa. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la primera cadena ligera incluye también una región variable Lambda. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la segunda cadena ligera incluye al menos una región constante Lambda. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la segunda cadena ligera incluye también una región variable Lambda. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la segunda cadena ligera incluye también una región variable Kappa. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, la primera cadena ligera incluye una región constante Kappa y una región variable Kappa, y la segunda cadena ligera incluye una región constante Lambda y una región variable Lambda. En algunos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos mediante el uso de este método, las secuencias de las regiones marco constante y variable son humanas.

55 Los anticuerpos biespecíficos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos generados mediante el uso de este método o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica se purifican mediante el uso de técnicas de cromatografía estándar usadas para la purificación de anticuerpos. Los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos generados mediante el uso de este método o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica también pueden purificarse mediante el uso de otras técnicas de separación, tales como a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, las técnicas de filtración de membrana y las técnicas de precipitación de proteínas. En una modalidad preferida, el anticuerpo biespecífico (o anticuerpos) y fragmento(s) de unión al antígeno del mismo se purifican mediante el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, cromatografía de afinidad en KappaSelect, cromatografía en LambdaFabSelect o cromatografía de afinidad en Proteína L.

65 La invención proporciona los métodos para purificar un anticuerpo monoclonal biespecífico que tiene una especificidad diferente en cada sitio de combinación y que consiste en dos copias de un polipéptido de cadena pesada simple y una

primera cadena ligera que incluye una región constante kappa y una segunda cadena ligera que incluye una región constante lambda. Estos métodos incluyen las etapas de: (i) proporcionar una composición de anticuerpos mixtos que comprende uno o más de los anticuerpos monoclonales biespecíficos que tienen una especificidad diferente en cada sitio de combinación y que consisten en dos copias de un polipéptido de cadena pesada simple y una primera cadena ligera que comprende una región constante kappa y una segunda cadena ligera que comprende una región constante lambda (AcM biespecífico); uno o más anticuerpos monoclonales mono-específicos que tienen dos cadenas ligeras lambda o porciones de las mismas (λ -AcM); y uno o más anticuerpos monoclonales mono-específicos que tienen dos cadenas ligeras kappa o porciones de las mismas (κ -AcM); (ii) proporcionar un medio de separación que tiene una afinidad específica por una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, en donde el medio de separación se acopla a un ligando que tiene alta especificidad y afinidad por una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, y en donde el ligando es un anticuerpo monoclonal anti-lambda o un anticuerpo monoclonal anti-kappa; (iii) poner en contacto el medio de separación con la composición de anticuerpos mixtos en condiciones que permitan la unión diferencial a los medios de separación por el Ac biespecífico en comparación con la unión a los medios de separación por las regiones constantes de cadena ligera kappa del κ -AcM o por las regiones constantes de cadena ligera lambda del λ -AcM; y (iv) eluir los anticuerpos del medio de separación en condiciones que permitan el desprendimiento preferencial del Ac biespecífico en comparación con el desprendimiento de las regiones constantes de cadena ligera kappa del κ -AcM o el desprendimiento de las regiones constantes de cadena ligera lambda del λ -AcM; en donde las condiciones de unión y/o elución incluyen una variación por etapas del nivel de pH, una variación por etapas de la concentración de sal inorgánica, una variación por etapas de la concentración de un aminoácido en la composición de anticuerpos mixtos, o la inclusión de uno o más agentes desnaturizantes.

En algunas modalidades, el medio de separación es una resina, una membrana, una perla magnética, una partícula o un monolito. En algunas modalidades, el medio de separación es una resina KappaSelect, una resina LambdaFabSelect o una resina de Proteína L. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo monoclonal anti-lambda o un anticuerpo monoclonal anti-kappa.

En algunas modalidades, las condiciones de unión y/o elución incluyen una variación por etapas del nivel de pH. En otras modalidades, las condiciones de unión y/o elución incluyen una variación por etapas de la concentración de sal inorgánica tal como la concentración de cloruro de sodio (NaCl) o la concentración de otras sales inorgánicas tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, combinaciones de sales inorgánicas de la serie de iones Hofmeister. En algunas modalidades, las condiciones de unión y/o elución incluyen una variación por etapas de la concentración de un aminoácido en la composición, tal como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, la concentración de arginina, histidina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano y/o glicina. En algunas modalidades, las condiciones de unión y/o elución incluyen uno o más agentes desnaturizantes suaves tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Polietilenglicol 2000, Polietilenglicol 8000, Tritón X-100, CHAPS, NP-40 y otros tensioactivos iónicos, no iónicos y/o zwitteriónicos.

En algunas modalidades, el método comprende la etapa adicional de determinar la pureza y las proporciones del anticuerpo biespecífico, κ -AcM y/o λ AcM en la fracción eluida. Esta etapa puede lograrse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas reconocidas, tales como a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrófobas (HIC-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC) o la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC).

El ejemplo proporcionado en la presente descripción demuestra la viabilidad del uso de una elución por pH más alto en etapas para eluir preferentemente el producto $\kappa\lambda$ -cuerpo biespecífico de la resina de afinidad KappaSelect sobre el κ -AcM mono-específico que eluye a un pH más bajo, ya que el AcM mono-específico presumiblemente tiene una mayor afinidad por la resina debido a la presencia de dos cadenas κ en el formato mono-específico en oposición a una sola cadena κ en el $\kappa\lambda$ -cuerpo. Los métodos descritos en la presente descripción son útiles en otros soportes de cromatografía donde la afinidad hacia la cadena ligera se usa para unir diferencialmente los productos mono-específicos y/o biespecíficos, tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, LambdaFabSelect, intercambio iónico, interacción hidrófoba y resinas de modo mixto (por ejemplo, hidroxipatita) y otras técnicas de cromatografía. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente otras técnicas reconocidas en la técnica que caerían dentro de esta categoría. Las estrategias de elución para separar los diferentes productos no solo deberían limitarse a la variación del pH, sino que también podrían abarcar, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, las técnicas de separación por intercambio catiónico que usan la variación por etapas de la concentración de sal tal como la concentración de NaCl o la concentración de otras sales inorgánicas (por ejemplo, combinaciones de sales inorgánicas de la serie de iones Hofmeister), la concentración de Arginina y otros aminoácidos tales como histidina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano y glicina, el uso de agentes desnaturizantes suaves tales como, por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Polietilenglicol 2000, Polietilenglicol 8000, Tritón X-100, CHAPS, NP-40 y otros tensioactivos iónicos, no iónicos y/o zwitteriónicos, etc.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a la eliminación eficiente de cadenas ligeras libres de anticuerpos intactos, incluidos anticuerpos mono-específicos, anticuerpos biespecíficos y mezclas de anticuerpos intactos. En particular, se han identificado condiciones de cromatografía que pueden aplicarse para aislar anticuerpos monoclonales biespecíficos o mono-específicos intactos o combinaciones de anticuerpos monoclonales biespecíficos o mono-específicos intactos de las cadenas ligeras libres.

Los ejemplos proporcionados en la presente descripción usan un anticuerpo biespecífico para el aislamiento por afinidad en modo mixto de moléculas de IgG intactas de una mezcla que contiene cadenas ligeras libres. Debe entenderse que esto es simplemente un ejemplo, y los métodos proporcionados en la presente descripción son útiles junto con cualquier proceso de fabricar de anticuerpos que genera componentes de anticuerpos incompletos (es decir, anticuerpos no intactos) que pueden estar presentes como monómeros o polímeros, y en una conformación nativa o alterada. Además, mientras que los ejemplos proporcionados en la presente descripción usan un medio de purificación que identifica anticuerpos IgG intactos, debe entenderse que este método puede usarse con cualquier medio de purificación que identifique otras moléculas de anticuerpos intactos.

5

10

Las moléculas de anticuerpos intactos generadas mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica pueden purificarse mediante el uso de las técnicas de separación por cromatografía en modo mixto proporcionadas en la presente descripción solas o junto con cualquier otra técnica de separación adecuada, tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, las técnicas de filtración en membrana y las técnicas de precipitación de proteínas.

15

La descripción proporciona los métodos para purificar un anticuerpo intacto o una combinación de anticuerpos intactos de una mezcla que contiene anticuerpos no intactos, incluidos componentes de anticuerpos, dímeros de componentes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o combinaciones de los mismos. La combinación de anticuerpos intactos puede incluir uno o más tipos diferentes de anticuerpos intactos, incluidos los anticuerpos que se unen a las mismas o a diferentes dianas. El anticuerpo intacto puede ser cualquier anticuerpo intacto, incluidos a modo de un ejemplo no limitante, anticuerpos monovalentes intactos, anticuerpos biespecíficos intactos, anticuerpos multiespecíficos intactos, anticuerpos monoclonales intactos, tales como anticuerpos completamente humanos intactos, anticuerpos humanizados intactos y/o otros anticuerpos quiméricos intactos. La combinación de anticuerpos intactos puede incluir cualquier combinación de anticuerpos intactos contra las mismas o diferentes dianas, incluidas, a modo de un ejemplo no limitante, una o más de las siguientes combinaciones: anticuerpos monovalentes intactos, anticuerpos biespecíficos intactos, anticuerpos multiespecíficos intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos completamente humanos intactos, anticuerpos humanizados intactos y/o otros anticuerpos quiméricos intactos.

20

25

En algunas modalidades, estos métodos incluyen las etapas de: (i) proporcionar una composición de anticuerpos mixtos que incluye uno o más de los anticuerpos intactos o una combinación de anticuerpos intactos y una o más moléculas de anticuerpos no intactos, que incluyen uno o más componentes de anticuerpos tales como una cadena ligera libre, uno o más dímeros de un componente de anticuerpo tal como una cadena ligera libre, y/o uno o más fragmentos de anticuerpo; (ii) proporcionar un medio de separación que tiene una afinidad diferencial entre una molécula de anticuerpo intacta en comparación con la molécula de anticuerpo no intacto; (iii) poner en contacto los medios de separación con la composición de anticuerpos mixtos en condiciones que permitan la unión diferencial a los medios de separación por la molécula de anticuerpo intacta o la combinación de anticuerpos intactos en comparación con la unión a los medios de separación por la molécula de anticuerpo no intacto (por ejemplo, uno o más componentes de anticuerpos, como una cadena ligera libre, uno o más dímeros de un componente de anticuerpo, tal como una cadena ligera libre, y/o uno o más fragmentos de anticuerpos); y (iv) separar el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos del medio de separación y retener el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos, purificando de esta manera el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos de la composición de anticuerpos mixtos. En algunas modalidades, el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos se separa del medio de separación mediante la elución del anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos en condiciones que permiten el desprendimiento preferencial del anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos en comparación con el desprendimiento de la molécula de anticuerpo no intacto (por ejemplo, uno o más componentes de anticuerpo, tales como una cadena ligera libre, uno o más dímeros de un componente de anticuerpo tal como una cadena ligera libre, y/o uno o más fragmentos de anticuerpo). En algunas modalidades, el medio de separación se pone en contacto con la composición de la mezcla de anticuerpos en condiciones que permiten la unión del anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos a los medios de separación, pero no permiten la unión entre la molécula de anticuerpo no intacto y el medio de separación. En algunas modalidades, el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos se separa de la fracción de anticuerpos no intactos al eliminar los anticuerpos no intactos no unidos de la composición de anticuerpos mixtos o al dejar que los anticuerpos no intactos no unidos fluyan a través del medio de separación y al descartar o eliminar de cualquier otra manera la fracción no retenida. En algunas modalidades, la molécula de anticuerpo no intacto es una cadena ligera libre.

30

35

40

45

50

En algunas modalidades, el medio de separación es una resina, una membrana, una perla magnética, una partícula o un monolito. En algunas modalidades, los medios de separación se acoplan a un ligando que tiene especificidad y afinidad diferencial por una molécula de anticuerpo intacta en comparación con una molécula de anticuerpo no intacto. En algunas modalidades, el medio de separación es un medio de cromatografía en modo mixto, tal como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrófobas (HIC-HPLC) o cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC). En algunas modalidades, el medio de cromatografía en modo mixto es Mep HyperCel™. Otros medios de cromatografía en modo mixto incluyen, por ejemplo, Capto™ MMC, Capto™ adhere, HEA HyperCel™, PPA HyperCel™, hidroxapatita cerámica CHT™ y Nuvia™ cPrime™. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo monoclonal anti-anticuerpo tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG.

55

60

En algunas modalidades, los métodos comprenden una etapa adicional para determinar la pureza y las proporciones del anticuerpo intacto en la fracción eluida. Esta etapa puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas reconocidas, tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, cromatografía líquida de alto

65

rendimiento basada en exclusión por tamaño (SEC-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrófobas (HIC-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC) o la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC).

5 En algunas modalidades, estos métodos incluyen las etapas de: (i) proporcionar una composición de anticuerpos mixtos que incluye uno o más de los anticuerpos intactos o una combinación de anticuerpos intactos y una o más moléculas de anticuerpos no intactos, que incluyen uno o más componentes de anticuerpos tales como una cadena ligera libre, uno o más dímeros de un componente de anticuerpo tal como una cadena ligera libre, y/o uno o más fragmentos de anticuerpo; (ii) proporcionar un medio de separación que tiene una afinidad diferencial entre una molécula de anticuerpo no intacto en comparación con una molécula de anticuerpo intacta; (iii) poner en contacto el medio de separación con la composición de anticuerpos mixtos en condiciones que permiten la unión al medio de separación por la molécula de anticuerpo no intacto pero que no permite la unión al medio de separación por el anticuerpo intacto o una combinación de anticuerpos intactos de manera que el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos permanece en la fracción no unida; y (iv) retener la fracción no unida que incluye el anticuerpo intacto o la combinación de anticuerpos intactos. En algunas modalidades, el método pueden incluir la etapa adicional de separar la molécula de anticuerpo no intacto del medio de separación. En algunas modalidades, la molécula de anticuerpo no intacto es una cadena ligera libre.

En algunas modalidades, el medio de separación es una resina, una membrana, una perla magnética, una partícula o un monolito. En algunas modalidades, el medio de separación se acopla a un ligando que tiene especificidad y afinidad diferencial por una molécula de anticuerpo intacta. En algunas modalidades, el medio de separación es un medio de cromatografía en modo mixto, tal como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrófobas (HIC-HPLC) o cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC). En algunas modalidades, el medio de cromatografía en modo mixto es Mep HyperCel™. Otros medios de cromatografía en modo mixto incluyen, por ejemplo, Capto™ MMC, Capto™ adhere, HEA HyperCel™, PPA HyperCel™, hidroxiapatita cerámica CHT™ y Nuvia™ cPrime™. En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo monoclonal anti-anticuerpo tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG.

En algunas modalidades, los métodos comprenden una etapa adicional para determinar la pureza y las proporciones del anticuerpo intacto en la fracción eluida. Esta etapa puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas reconocidas, tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, cromatografía líquida de alto rendimiento basada en exclusión por tamaño (SEC-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrófobas (HIC-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC) o la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC).

35 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C son una representación esquemática de la estructura de diferentes anticuerpos biespecíficos en formato de $\kappa\lambda$ -cuerpo compuestos por dos copias de un polipéptido de cadena pesada única y dos polipéptidos de cadena ligera diferentes. Las localizaciones y/o disposiciones de la cadena ligera Kappa y la cadena ligera Lambda (o porciones de las mismas) mostradas en estas figuras no pretenden ser limitantes. Los expertos en la técnica apreciarán que la cadena ligera Kappa y la cadena ligera Lambda (o porciones de las mismas) también pueden disponerse para producir la imagen espectral de los anticuerpos biespecíficos mostrados en las Figuras 1A-1C. Los expertos en la técnica también apreciarán que los anticuerpos biespecíficos que se representan en las Figuras 1A-1C en un formato de IgG completa también pueden generarse mediante el uso de otros isotipos de inmunoglobulina o en otros formatos de inmunoglobulina tal como $F(ab)_2$. Figura 1A. Dominio variable Kappa fusionado a un dominio constante Kappa y dominio variable Lambda fusionado a un dominio constante Lambda. Figura 1B. DSominios variables Kappa fusionados a un dominio constante Kappa y al dominio constante Lambda. Figura 1C. Dominios variables Lambda fusionados a un dominio constante Kappa y a un dominio constante Lambda.

50 La Figura 2 es una ilustración que representa que la expresión del vector de expresión tri-cistrónico en las células CHO da lugar a tres productos de anticuerpos con una relación teórica de 25:50:25 para los productos de IgG (etiquetado "IgG" en el panel central) y una mezcla de cadenas ligeras libres (FLC) y dímeros de estas FLC (etiquetadas "FLC" en el panel inferior).

La Figura 3A es un gráfico que representa un perfil de traza UV representativo de la cromatografía de afinidad en KappaSelect mediante el uso de la elución por pH en etapas.

La Figura 3B es una ilustración que representa la SDS-PAGE no reducida y reducida de las fracciones de elución de KappaSelect.

La Figura 3C es un gráfico que representa el análisis por IEX-HPLC de las fracciones de elución de KappaSelect.

La Figura 4A es un gráfico que representa un perfil de traza UV representativo de la cromatografía de afinidad en LambdaFabSelect mediante el uso de la elución por pH en etapas.

La Figura 4B es una ilustración que representa la SDS-PAGE no reducida y reducida de las fracciones de elución de LambdaFabSelect.

La Figura 4C es un gráfico que representa el análisis por HIC-HPLC de las fracciones de elución en LambdaFabSelect.

La Figura 5A es un gráfico que representa un perfil de traza UV representativo de la cromatografía en modo mixto en Mep HyperCel™ mediante el uso de la elución por pH en etapas.

La Figura 5B es una ilustración que representa la SDS-PAGE no reducida y reducida de fracciones de elución de Mep HyperCel™.

La Figura 5C es un gráfico que representa el análisis de HIC-HPLC de las fracciones de elución en Mep HyperCel™.

5 Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La descripción proporciona una variedad de técnicas que usan medios de purificación específicos de anticuerpos y reactivos relacionados para separar y aislar un producto de anticuerpo deseado de una mezcla de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, componentes de anticuerpos tales como cadenas ligeras libres y combinaciones de los mismos. Los métodos proporcionados en la presente descripción separan rápidamente y eficientemente un producto de anticuerpo deseado de una mezcla de anticuerpos y/o fragmentos del mismo.

La descripción proporciona los métodos para purificar anticuerpos biespecíficos que son idénticos en estructura a una inmunoglobulina humana. Este tipo de molécula está compuesta de dos copias de un polipéptido de cadena pesada único, una primera región variable de cadena ligera fusionada a un dominio constante Kappa y una segunda región variable de cadena ligera fusionada a un dominio constante Lambda. Cada sitio de combinación muestra una especificidad diferente por el antígeno a la que contribuyen tanto la cadena pesada como la ligera. Las regiones variables de cadena ligera pueden ser de la familia Lambda o Kappa y se fusionan preferentemente a un dominio constante Lambda y Kappa, respectivamente. Esto se prefiere para evitar la generación de uniones no naturales de polipéptidos. Sin embargo, también es posible obtener los anticuerpos biespecíficos de la descripción mediante la fusión de un dominio variable de cadena ligera Kappa a un dominio constante Lambda para una primera especificidad y fusionar un dominio variable de cadena ligera Lambda a un dominio constante Kappa para la segunda especificidad (Figura 1). Los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente descripción también se denominan anticuerpos IgGκλ o "κλ-cuerpos", un formato de IgG biespecífica completamente humana. Este formato de κλ-cuerpo permite la purificación por afinidad de un anticuerpo biespecífico que puede distinguirse de un anticuerpo monoclonal estándar, por ejemplo, es conveniente por lo tanto, una molécula de IgG estándar, en comparación con los formatos anteriores.

Los κλ-cuerpos se generan al identificar dos regiones Fv de anticuerpo (cada una compuesta por un dominio de cadena ligera variable y de cadena pesada variable) que tienen diferentes especificidades por el antígeno que comparten el mismo dominio variable de la cadena pesada.

La presente descripción también proporciona los métodos para purificar anticuerpos intactos de mezclas que contienen moléculas de anticuerpo no intacto, que incluyen, por ejemplo, componentes de anticuerpos, dímeros de componentes de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos y/o combinaciones de los mismos.

Los κλ-cuerpos y/o los anticuerpos intactos a purificar mediante el uso de los métodos de la descripción se generan mediante el uso de cualquiera de una variedad de métodos para generar anticuerpos. Se han descrito numerosos métodos para la generación de anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. (Ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las CDR 1 y 2, surgen de genes humanos. La región CDR3 puede ser de origen humano o estar diseñada por medios sintéticos. Tales anticuerpos se denominan en la presente descripción "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos". Pueden prepararse los anticuerpos monoclonales humanos mediante el uso de la técnica de trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (ver Kozbor, y otros, 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (ver Cole, y otros, 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse mediante el uso de hibridomas humanos (ver Cote, y otros, 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o mediante la transformación in vitro de células B humanas con el Virus de Epstein Barr (ver Cole, y otros, 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

Los anticuerpos monoclonales se generan, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal con un antígeno diana o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Alternativamente, el animal se inmuniza con las células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno diana, de manera que el antígeno diana se expresa y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Una variedad de técnicas son bien conocidas en la técnica para producir animales xenogénicos no humanos. Por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 6,075,181 y núm. 6,150,584.

Alternativamente, los anticuerpos se obtienen mediante el tamizaje de una biblioteca que contiene secuencias del anticuerpo o del dominio de unión o al antígeno para la unión al antígeno diana. Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en bacteriófagos como fusiones de proteínas o péptidos a una proteína de cubierta de bacteriófagos que se expresa en la superficie de las partículas de fago ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fago (es decir, "biblioteca presentada en fagos").

Los hibridomas que resultan de las fusiones de microma/células B se tamizan después para determinar la reactividad con el antígeno diana. Los anticuerpos monoclonales se preparan, por ejemplo, mediante el uso de los métodos del hibridoma

tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal huésped adecuado, típicamente se inmuniza con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

Aunque no es estrictamente imposible, la identificación fortuita de diferentes anticuerpos que tienen el mismo dominio variable de cadena pesada pero se dirigen contra diferentes antígenos es altamente improbable. De hecho, en la mayoría de los casos, la cadena pesada contribuye en gran medida a la superficie de unión del antígeno y también es la secuencia más variable. En particular, la CDR3 en la cadena pesada es la CDR más diversa en secuencia, longitud y estructura. Por lo tanto, dos anticuerpos específicos para antígenos diferentes portarán casi invariablemente dominios variables de cadena pesada diferentes.

En algunas modalidades, los κ -cuerpos y/o los anticuerpos intactos a purificar se generan, por ejemplo, mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos en las que el dominio variable de cadena pesada es el mismo para todos los miembros de la biblioteca y, por lo tanto, la diversidad se limita al dominio variable de la cadena ligera. Tales bibliotecas se describen, por ejemplo, en la solicitud pendiente PCT/US2010/035619, presentada el 20 de mayo de 2010 y publicada el 25 de noviembre de 2010 como publicación PCT núm. WO 2010/135558 y la solicitud pendiente PCT/US2010/057780, presentada el 23 de noviembre de 2010 y publicada el 14 de julio de 2011 como publicación PCT núm. WO 2011/084255. Sin embargo, como el dominio variable de cadena ligera se expresa junto con el dominio variable de cadena pesada, ambos dominios pueden contribuir a la unión al antígeno. Para facilitar aún más el proceso, las bibliotecas de anticuerpos que contienen el mismo dominio variable de cadena pesada y una diversidad de cadenas ligeras variables Lambda o cadenas ligeras variables Kappa pueden usarse en paralelo para la selección *in vitro* de anticuerpos contra diferentes antígenos. Este enfoque facilita la identificación de dos anticuerpos que tienen una cadena pesada común pero uno lleva un dominio variable de cadena ligera Lambda y el otro un dominio variable de cadena ligera de Kappa que pueden usarse como bloques de construcción para la generación de un anticuerpo biespecífico en el formato de inmunoglobulina completa de la descripción. Los anticuerpos biespecíficos a purificar mediante el uso de los métodos de la descripción pueden ser de diferentes isotipos y su porción Fc puede modificarse para alterar las propiedades de unión a diferentes receptores de Fc y de esta manera modificar las funciones efectoras del anticuerpo, así como también las propiedades farmacocinéticas. Se han descrito numerosos métodos para la modificación de la porción Fc y pueden aplicarse a los anticuerpos de la descripción. (Ver por ejemplo Strohl, WR Curr Opin Biotechnol 2009 (6):685-91; patente de Estados Unidos núm. 6,528,624; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2009/0191199 presentada el 9 de enero de 2009). Los métodos de la descripción también pueden usarse para purificar anticuerpos biespecíficos y mezclas de anticuerpos en un formato F(ab')₂ que carece de la porción Fc.

Preferentemente, los κ -cuerpos a purificar se optimizan para la coexpresión de la cadena pesada común y dos cadenas ligeras diferentes en una sola célula para permitir el ensamblaje de un anticuerpo biespecífico de la descripción. Si todos los polipéptidos se expresan al mismo nivel y se ensamblan igualmente bien para formar una molécula de inmunoglobulina, entonces la relación de mono-específico (mismas cadenas ligeras) y biespecífico (dos cadenas ligeras diferentes) debería ser del 50 %. Sin embargo, es probable que diferentes cadenas ligeras se expresan a diferentes niveles y/o no se ensamblan con la misma eficiencia. Además, las cadenas ligeras que escapan del ensamblaje en una molécula de IgG intacta pueden secretarse en el sobrenadante del cultivo celular como "cadenas ligeras libres" (FLC). Los medios para modular la expresión relativa de los diferentes polipéptidos para compensar sus características de expresión intrínsecas o las diferentes propensiones a ensamblarse con la cadena pesada común incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, el uso de promotor(es) con resistencias(s) variable(s), el uso de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) que presentan diferentes eficiencias u otros tipos de elementos reguladores que pueden actuar a niveles transcripcionales o traduccionales, así como también que actúan sobre la estabilidad del ARNm. Puede lograrse también la modulación de la expresión mediante múltiples transfecciones secuenciales de células para aumentar el número de copias de genes individuales que expresan una u otra cadena ligera y así modificar sus expresiones relativas.

La coexpresión de la cadena pesada y las dos cadenas ligeras genera una mezcla de tres anticuerpos diferentes que se secretan en el sobrenadante del cultivo celular: dos anticuerpos mono-específicos bivalentes y un anticuerpo biespecífico bivalente. Este último tiene que purificarse de la mezcla para obtener el κ -cuerpo de interés. Los métodos de purificación descritos en la presente descripción facilitan enormemente el procedimiento de purificación mediante el uso de los medios de cromatografía de afinidad que interactúan específicamente con los dominios constantes de cadena ligera Kappa o Lambda, tales como el medio de afinidad KappaSelect, el medio de afinidad LambdaFabSelect y/o la Proteína L, y las matrices de afinidad CaptureSelect Fab Kappa y CaptureSelect Fab Lambda. Este enfoque de purificación por cromatografía de afinidad es eficiente y generalmente se aplica a los anticuerpos biespecíficos, que incluyen los κ -cuerpos. Esto está en marcado contraste con los métodos de purificación específicos que deben desarrollarse y optimizarse para cada anticuerpo biespecífico derivado de cuádrimas u otras líneas celulares que expresan mezclas de anticuerpos. De hecho, si las características bioquímicas de los diferentes anticuerpos en las mezclas son similares, su separación mediante el uso de una técnica de cromatografía estándar, tal como la cromatografía de intercambio iónico puede ser un desafío o no ser posible en absoluto.

La coexpresión de las tres cadenas condujo al ensamblaje de tres anticuerpos diferentes: dos anticuerpos mono-específicos y uno biespecífico. Sus relaciones teóricas relativas deberían ser 1:1:2 siempre que los niveles de expresión y las velocidades de ensamblaje sean similares para ambas cadenas ligeras. Los anticuerpos biespecíficos se

purificaron mediante el uso de procedimientos de cromatografía de afinidad que eluyen preferentemente los anticuerpos biespecíficos, tales como los $\kappa\lambda$ -cuerpos, mediante el uso de las resinas de afinidad.

5 La coexpresión de las tres cadenas también condujo a la generación de un exceso de cadena ligera libre en el sobrenadante del cultivo celular. Tales cadenas ligeras libres pueden ser potencialmente problemáticas de eliminar en los procesos de purificación omitiendo, por ejemplo, la cromatografía de afinidad por proteína A. Las cadenas ligeras libres podrían separarse eficientemente de la mezcla de anticuerpos intactos mediante el uso de la cromatografía en modo mixto como se demuestra en la presente descripción.

10 Se realizaron enfoques previos para producir y purificar formatos de anticuerpos biespecíficos destinados a forzar la producción de una molécula biespecífica homogénea mediante el uso de diferentes enfoques de ingeniería de anticuerpos a expensas de la productividad, la escalabilidad y la estabilidad del producto. Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan un medio eficiente y genérico para purificar el anticuerpo biespecífico de una mezcla que contiene anticuerpos monoclonales y monovalentes y cadenas ligeras libres.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación de anticuerpos biespecíficos que portan una cadena ligera Lambda y Kappa

20 El $\kappa\lambda$ -cuerpo es un nuevo formato de IgG biespecífica que comprende una cadena pesada común de IgG1 y dos cadenas ligeras diferentes que dirigen su especificidad a dos dianas independientes. Para permitir un protocolo de purificación eficiente que pueda aplicarse a procesos industriales a gran escala, el formato requiere que una cadena ligera contenga una región constante κ mientras que la otra contenga una región constante λ . (Ver la Figura 1).

25 Para producir el $\kappa\lambda$ -cuerpo, la cadena pesada común y las dos cadenas ligeras se expresan en las células CHO mediante el uso de un vector de expresión tri-cistrónico. Este formato de vector permite la construcción de tres productos: anticuerpo monoclonal (AcM) monoespecífico κ , $\kappa\lambda$ -cuerpo biespecífico y λ -AcM monoespecífico. Se suponen niveles de expresión y ensamblaje similares con la cadena pesada entre las cadenas ligeras Kappa y Lambda, la relación teórica del producto es 25:50:25 además de las cadenas ligeras libres. (Ver la Figura 2).

30

La purificación de este formato de $\kappa\lambda$ -cuerpo puede realizarse mediante la unión secuencial a resinas de afinidad KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare), como se describe, por ejemplo, en la solicitud pendiente de Estados Unidos núm. 13/210,723, presentada el 16 de agosto de 2011. Estas resinas se acoplan con los ligandos de dominio que tienen alta especificidad y afinidad por la región constante κ o λ . Sin embargo, existe la necesidad de procesos de purificación mejorados y rentables que permitan la purificación a gran escala de los $\kappa\lambda$ -cuerpos y otros anticuerpos biespecíficos. Se prevé la eliminación de la etapa de captura del sobrenadante mediante afinidad por proteína A y es posible siempre que puedan eliminarse las cadenas ligeras libres de la mezcla antes de la cromatografía de afinidad en KappaSelect y LambdaFabSelect.

35

40 Con el objetivo de racionalizar el proceso de purificación, se planteó la hipótesis de que el $\kappa\lambda$ -cuerpo se uniría a las resinas KappaSelect o LambdaFabSelect con una afinidad más débil que el subproducto κ -AcM monoespecífico correspondiente (para KappaSelect) o λ -AcM monoespecífico (para LambdaFabSelect) debido al hecho de que contiene solo una cada cadena ligera en lugar de dos para el formato monoclonal (ya sea κ o λ). Además, se planteó la hipótesis de que las cadenas ligeras libres podrían separarse del anticuerpo intacto mediante el uso de la cromatografía en modo mixto para capturar directamente la proteína recombinante del sobrenadante. (Ver la Figura 2).

45

Los estudios proporcionados en la presente descripción demuestran la separación exitosa del $\kappa\lambda$ -cuerpo del Ac monoespecífico kappa mediante el uso de la elución por pH en etapas durante la cromatografía de afinidad en KappaSelect o LambdaFabSelect.

50

Material de inicio: Para la cromatografía en KappaSelect, se usó el sobrenadante de fermentación de bolsa de onda de 25L clarificada de una célula CHO transfectada con un vector de expresión biespecífico $\kappa\lambda$ (que contiene un ADNc de cadena pesada $\gamma 1$, un ADNc de cadena ligera κ y un ADNc de cadena ligera λ) como material de partida para la purificación. Para la cromatografía en LambdaFabSelect y en modo mixto, se usó el sobrenadante clarificado de una fermentación de 100L BIOSTAT CultiBag STR de una célula CHO transfectada con un vector de expresión biespecífico $\kappa\lambda$ (que contiene un ADNc de cadena pesada $\gamma 1$, un ADNc de cadena ligera κ y un ADNc de cadena ligera λ) como material de partida para la purificación.

55

Etapa de cromatografía en KappaSelect: Un anticuerpo IgG biespecífico en formato de $\kappa\lambda$ -cuerpo anti-IFN γ /IL-6RC (es decir, IL-6RC es el complejo que se forma entre IL-6 e IL-6R) se purificó mediante el uso de medios de cromatografía de afinidad en KappaSelect (GE Healthcare). Más abajo se muestran las secuencias aminoacídicas de la cadena pesada y ligera del anticuerpo IgG biespecífico en formato de $\kappa\lambda$ -cuerpo anti-IFN γ /IL-6RC:

60

Cadena ligera VKappa anti-IL6RC

65

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
 FSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQWLPITPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
 5 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

Cadena ligera VLambda anti-IFN γ

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSPGVPD
 10 RFSGSIIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSQSWDGNHIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT
 LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYAASSY
 LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 5)

Cadena pesada común

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
 15 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGLVTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP
 20 KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCL
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
 25 HEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO: 6).

Después de cargar la columna a 10 mg/ml y una etapa de lavado con fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 (5 volúmenes de columna), se realizó una elución por pH en etapas (pH 3,0 seguido de pH 2,5 y pH 2,0) mediante el uso de una solución tampón de glicina 50 mM ajustada al pH relevante. El flujo continuo (F/C) y las fracciones eluidas se recolectaron y analizaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm (mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop UV-Vis, Thermo Scientific) para determinar la recuperación del producto, SDS-PAGE reducida y no reducida (mediante el uso de geles en gradiente de 4-20 % de 12 pocillos Novex NuPAGE de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante) para determinar la pureza y la composición de las muestras y la cromatografía líquida de alto rendimiento basada en intercambio iónico (IEX-HPLC; método descrito más abajo) para determinar la capacidad del proceso de purificación para separar la IgG biespecífica en formato de κ L-cuerpo de los dos subproductos de anticuerpos mono-específicos.

Método de IEX-HPLC: Este método de cromatografía líquida de alto rendimiento basado en intercambio iónico (IEX-HPLC) se usó para determinar las proporciones de los anticuerpo mono-específicos y biespecíficos en las muestras purificadas. El método de IEX-HPLC permite la separación de variantes de proteínas de acuerdo con su distribución de carga. Las muestras se prepararon para cargar 50 μ g en una columna BioMab NP5-SS (Agilent) y se aplicó un gradiente lineal de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 6,5 (de 0 % a 100 % de concentración de NaCl) a una tasa de flujo de 0,8ml/min para separar los diferentes productos de anticuerpo. Se empleó la detección UV a 214 nm para monitorear la elución de la muestra. Las tres poblaciones se identificaron (de acuerdo con los estándares de referencia) y se analizaron de acuerdo con su porcentaje de área relativa. Se determinó el porcentaje de cada isoforma calculando el área máxima de cada componente con relación al área máxima total.

Como se muestra en la Figura 3A por la traza UV (azul), las tres eluciones por pH en etapas aplicadas a la resina de cromatografía KappaSelect permitieron el aislamiento secuencial de las tres fracciones unidas. El análisis por SDS-PAGE no reducido, mostrado en la Figura 3B reveló la alta pureza de las fracciones eluidas que contienen anticuerpos de longitud completa ensamblados como se previó. También se detectaron algunos productos de cadena ligera libre (en formas de monómero y dímero). El análisis por SDS-PAGE reducido sugirió que las etapas consecutivas de elución por pH conducen a la retención diferencial del κ L-cuerpo en relación con los dos anticuerpos mono-específicos, basado en la composición de cadena ligera. La fracción de elución a pH 3,0 contenía niveles equivalentes de ambas cadenas ligeras, mientras que las fracciones a pH 2,5 y pH 2,0 presentaron niveles mínimos o no detectables de la cadena ligera λ . Las tres fracciones unidas se caracterizaron además integrando las áreas máximas de los cromatogramas de IEX-HPLC (Figura 3C). Los resultados resumidos en la Tabla 1 estaban en correspondencia con el análisis de SDS-PAGE, lo que demuestra la gran abundancia del κ L-cuerpo (70,10 %) en la primera fracción eluida a pH 3,0. Las etapas de elución posteriores a pH 2,5 y pH 2,0 dieron como resultado la elución del anticuerpo κ mono-específico. Por lo tanto, se demostró que una estrategia de elución por pH en etapas con la resina KappaSelect separa con eficacia el κ L-cuerpo biespecífico del AcM κ y λ mono-específico.

Tabla 1. Integración del máximo de UV del análisis de IEX-HPLC de las fracciones unidas a Kappa Select

Muestras	% de área	
	mono-k	κλ-cuerpo
KappaSelect pH 3,0	29,90	70,10
KappaSelect pH 2,5	58,65	41,35
KappaSelect pH 2,0	89,01	10,99

Estos datos demuestran la viabilidad de usar una elución por pH más alto en etapas para eluir preferentemente el producto κλ-cuerpo biespecífico de la resina de afinidad KappaSelect sobre el κ-AcM mono-específico el cual eluye a un pH más bajo. Esto se debe supuestamente a una mayor afinidad con la resina debido a la presencia de dos cadenas κ en el formato mono-específico en oposición a una única cadena κ en el κλ-cuerpo.

Por tanto, esta separación es útil además en otros soportes de cromatografía donde la afinidad hacia la cadena ligera se usa para unir diferencialmente los productos mono-específicos y/o biespecíficos, tales como, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, LambdaFabSelect, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y resinas de modo mixto (por ejemplo, hidroxiapatita). Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente otras técnicas reconocidas en la técnica que caerían dentro de esta categoría. Las estrategias de elución para separar los diferentes productos no solo deberían limitarse a la variación del pH, sino que también podrían abarcar, a modo de un ejemplo no limitante y no exhaustivo, las técnicas de separación por intercambio catiónico que usan la variación por etapas de la concentración de sal tal como la concentración de NaCl o la concentración de otras sales inorgánicas (por ejemplo, combinaciones de sales inorgánicas de la serie de iones Hofmeister), la concentración de Arginina y otros aminoácidos tales como histidina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano y glicina, el uso de agentes desnaturizantes suaves tales como, por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Polietilenglicol 2000, Polietilenglicol 8000, Tritón X-100, CHAPS, NP-40 y otros tensioactivos iónicos, no iónicos y/o zwitteriónicos, etc.

Etapas de cromatografía en LambdaFabSelect: Se purificó un anticuerpo IgG biespecífico en formato de κλ-cuerpo anti-IL-6Rc/IL-6RC mediante el uso de medios de cromatografía de afinidad en LambdaFabSelect (GE Healthcare). A continuación se muestran las secuencias aminoácidas de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo IgG biespecífico en formato de κλ-cuerpo anti-IL-6Rc/IL-6RC:

Cadena ligera VKappa anti-IL6RC

```
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISISLEPEDFAVYYCQQWLPTTTPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)
```

Cadena ligera VLambda anti-IL6RC

```
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINYSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVS
NRFSGSKSGNTASLISGLQAEDADYICSSWDAEFRAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKRYAASSYLS
LTPEQWQKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 7)
```

Cadena pesada común

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
DSVKGREFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTLC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 6)
```

Después de cargar la columna a 20 mg/ml y una etapa de lavado con fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 (5 volúmenes de columna), se realizó una elución por pH en etapas mediante el uso de un tampón de glicina 50 mM ajustado a pH 3,0. El flujo continuo y las fracciones eluidas se recolectaron y analizaron mediante la medición de absorbancia a 280 nm para determinar la recuperación del producto (mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop UV-Vis, Thermo Scientific), SDS-PAGE reducida y no reducida (mediante el uso de geles en gradiente 4-20 % de 12 pocillos Novex NuPAGE de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante) para determinar la pureza y la composición de las muestras y cromatografía líquida de alto rendimiento basada en interacciones hidrofóbicas (HIC-HPLC; método descrito más abajo) para determinar la capacidad del proceso de purificación para separar la IgG biespecífica en formato de κλ-cuerpo de los dos subproductos de anticuerpo mono-específico.

Método de HIC-HPLC: Para determinar las proporciones relativas de λ-AcM, κ-AcM y del κλ-cuerpo en una mezcla de muestra, se usó un ensayo de HIC-HPLC (cromatografía de interacciones hidrófobas) mediante el uso de una columna Dionex ProPac HIC-10, se aplicó un gradiente descendente entre el 85 y el 25 % de sulfato de amonio a la columna después de cargar la muestra para eluir las 3 especies con alta resolución, se eluyó primero el κ-AcM, seguido del κλ-cuerpo y finalmente el λ-AcM. Se realizó la integración del área máxima de la traza UV monitoreada a 280 nm para determinar la cantidad de cada especie.

Como se muestra por la traza UV en la Figura 4A, la etapa de elución por pH aplicada a la resina de cromatografía en LambdaFabSelect permitió la purificación del κλ-cuerpo. El análisis por SDS-PAGE no reducido, mostrado en la Figura 4B, reveló la alta pureza de la fracción purificada que contiene anticuerpos de longitud completa ensamblados como se previó. También se detectaron por SDS-PAGE no reducida algunos productos de cadena ligera libre (en formas de monómero y dímero). La fracción purificada se caracterizó adicionalmente mediante la integración de las áreas máxima de los cromatogramas de HIC-HPLC (Figura 4C). Los resultados resumidos en la Tabla 2 estaban en correspondencia con el análisis por SDS-PAGE: lo que demuestra la gran abundancia del κλ-cuerpo (89,4 %) en la fracción eluida a pH 3,0.

Tabla 2. Integración del máxima de UV del análisis de HIC-HPLC de las fracciones unidas a LambdaFabSelect

Muestras	% de área		
	mono-λ	κλ-cuerpo	mono-κ
Flujo continuo en LambdaFabSelect	No detectado	No detectado	100 %
Eluato de LambdaFabSelect a pH 3,0	10,6 %	89,4 %	No detectado
Desorción de LambdaFabSelect	100,0 %	No detectado	No detectado

Reducción de la cadena ligera libre mediante el uso de la cromatografía en modo mixto Mep HyperCel™: Para disminuir los costos de fabricación, la industria biotecnológica/farmacéutica desarrolla procesos de purificación que omiten la etapa inicial de cromatografía de afinidad por proteína A. Actualmente se están explorando soluciones alternativas de purificación. En particular, la cromatografía en modo mixto ofrece una selectividad novedosa que explota una combinación de interacciones tanto iónicas como hidrófobas que permiten el aislamiento selectivo de anticuerpos de los contaminantes del cultivo celular. Estos contaminantes pueden incluir proteínas de la célula huésped, ADN celular, endotoxinas, virus, así como también fragmentos de anticuerpo. Como se describió anteriormente, las células de mamífero que expresan anticuerpos recombinantes también secretan en el sobrenadante cadenas ligeras libres no ensambladas.

La presente descripción se refiere a la eliminación eficiente de las cadenas ligeras libres de anticuerpos mono-específicos y bis-específicos. En particular, se han identificado condiciones de cromatografía que pueden aplicarse para anticuerpos monoclonales bis-específicos o mono-específicos y las cadenas ligeras libres. La presente descripción se ilustra mediante un método para reducir los contaminantes de cadena ligera libre del sobrenadante de una línea celular CHO que expresa el κλ-cuerpo (ver las Figuras 5A-5C). El método comprende las siguientes etapas: a) aplicar el sobrenadante del cultivo celular a una resina de modo mixto de cromatografía sólida (por ejemplo, MEP. HyperCel), b) eluir el anticuerpo monoclonal con un tampón de elución tamponado con acetato a un pH 5,0 (eluato) y c) eliminar las cadenas ligeras libres que están fuertemente unidas a la resina a un pH 2,1 (desorción).

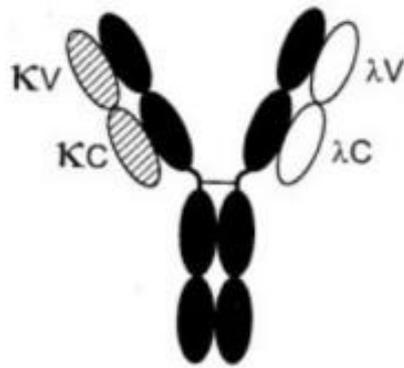
La Figura 5A muestra un cromatograma de MEP HyperCel representativo que demuestra la presencia de FLC en la desorción como se determina mediante la SDS PAGE no reducida (Figura 5B). El análisis por SEC HPLC confirmó la eliminación eficiente de FLC del 60 % en el sobrenadante del cultivo celular hasta el 33 % en la fracción de eluato de anticuerpos (Figura 5C) y la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3: Análisis de las fracciones de cromatografía de Mep HverCel™ por SEC-HPLC.

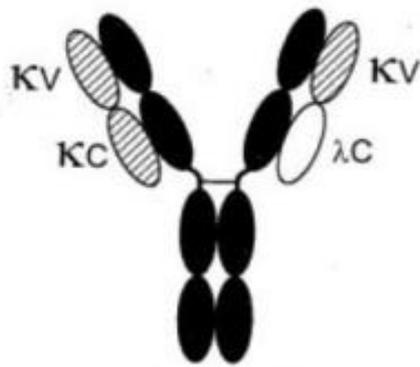
	Especies de alto peso molecular	Monómero de IgG	Cadenas ligeras libres
Cosecha de volumen no procesado	1,8 %	32,2 %	66,0 %
Flujo continuo	No detectadas	No detectado	No detectadas
Eluato	0,9 %	66,1 %	33,0 %
Desorción	No detectadas	No detectado	100,0 %

REIVINDICACIONES

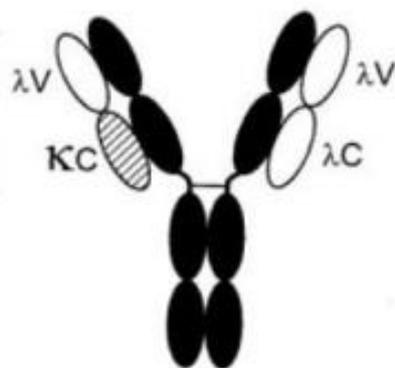
1. Un método para purificar un anticuerpo biespecífico que consiste en dos copias de un polipéptido de cadena pesada simple y una primera cadena ligera que comprende una región constante kappa y una segunda cadena ligera que comprende una región constante lambda, el método comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una composición de anticuerpos mixtos que comprende uno o más de los anticuerpos biespecíficos que consisten en dos copias de un polipéptido de cadena pesada simple y una primera cadena ligera que comprende una región constante kappa y una segunda cadena ligera que comprende una región constante lambda (Ac biespecífico); uno o más anticuerpos monoclonales monoespecíficos que tienen dos cadenas ligeras lambda o porciones de las mismas (λ -AcM); y uno o más anticuerpos monoclonales monoespecíficos que tienen dos cadenas ligeras kappa o porciones de las mismas (κ -AcM);
- 10 (b) proporcionar un medio de separación que tiene una afinidad específica por una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, en donde el medio de separación se acopla a un ligando que tiene una alta especificidad y afinidad por una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, y en donde el ligando es un anticuerpo monoclonal anti-lambda o un anticuerpo monoclonal anti-kappa;
- 15 (c) poner en contacto los medios de separación con la composición de anticuerpos mixtos en condiciones que permitan la unión diferencial al medio de separación por el Ac biespecífico en comparación con la unión al medio de separación por las regiones constantes de cadena ligera kappa del κ -AcM o por las regiones constantes de cadena ligera lambda del λ -AcM; y
- 20 (d) eluir los anticuerpos del medio de separación en condiciones que permitan el desprendimiento preferencial del Ac biespecífico en comparación con el desprendimiento de las regiones constantes de cadena ligera kappa del κ -AcM o el desprendimiento de las regiones constantes de cadena ligera lambda del λ -AcM; en donde las condiciones de unión y/o elución se seleccionan entre uno de: una variación por etapas del nivel de pH, una variación por etapas de la concentración de sal inorgánica, una variación por etapas de la concentración de un aminoácido en la composición de anticuerpos mixtos, o la inclusión de uno o más agentes desnaturizantes.
- 25
2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de separación es una resina, una membrana, una perla magnética, una partícula o un monolito.
- 30
3. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de separación es una resina KappaSelect, una resina LambdaFabSelect o una resina que contiene Proteína L.
- 35
4. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de unión y/o elución comprenden una variación por etapas del nivel de pH.
5. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de unión y/o elución comprenden una variación de la concentración de un aminoácido en la composición.
- 40
6. El método de la reivindicación 5, en donde el aminoácido es arginina, histidina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano y/o glicina.
- 45
7. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (c) comprende poner en contacto los medios de separación en condiciones que permiten la unión del ACM biespecífico a los medios de separación pero no permiten la unión de las regiones constantes de cadena ligera kappa del κ -AcM o de las regiones constantes de cadena ligera lambda del λ -AcM a los medios de separación.
- 50
8. El método de la reivindicación 7, en donde la etapa (c) comprende además la etapa de eliminar cualquier porción no unida de moléculas de anticuerpo biespecífico de la composición.
- 55
9. El método de la reivindicación 1, en donde las condiciones de unión de la etapa (c) comprenden una variación por etapas del nivel de pH, o las condiciones de elución de la etapa (d) comprenden una variación por etapas del nivel de pH, o ambas las condiciones de unión de la etapa (c) y las condiciones de elución de la etapa (d) comprenden una variación por etapas del nivel de pH.



Común H
FIG. 1A



Común H
FIG. 1B



Común H
FIG. 1C

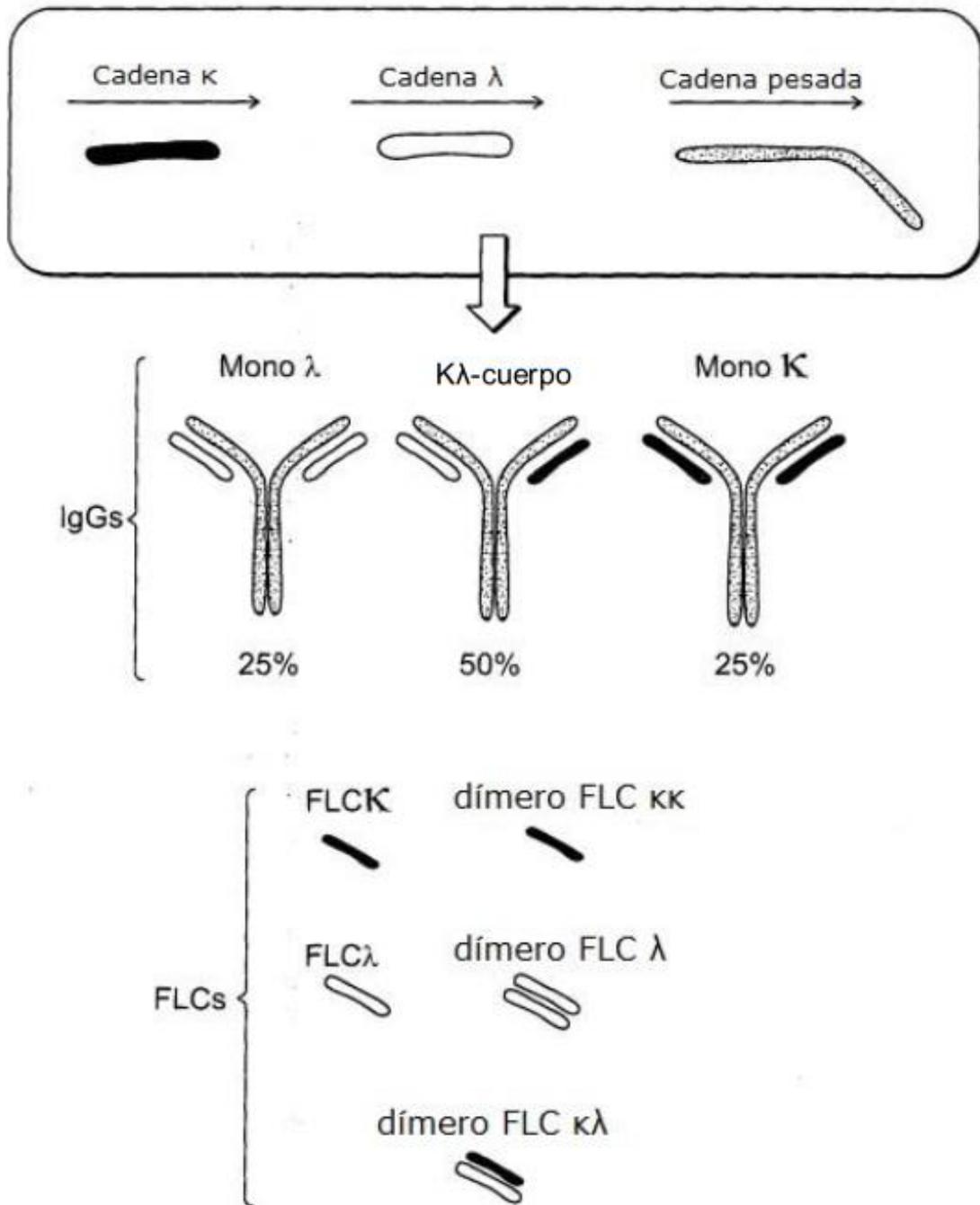


FIG. 2

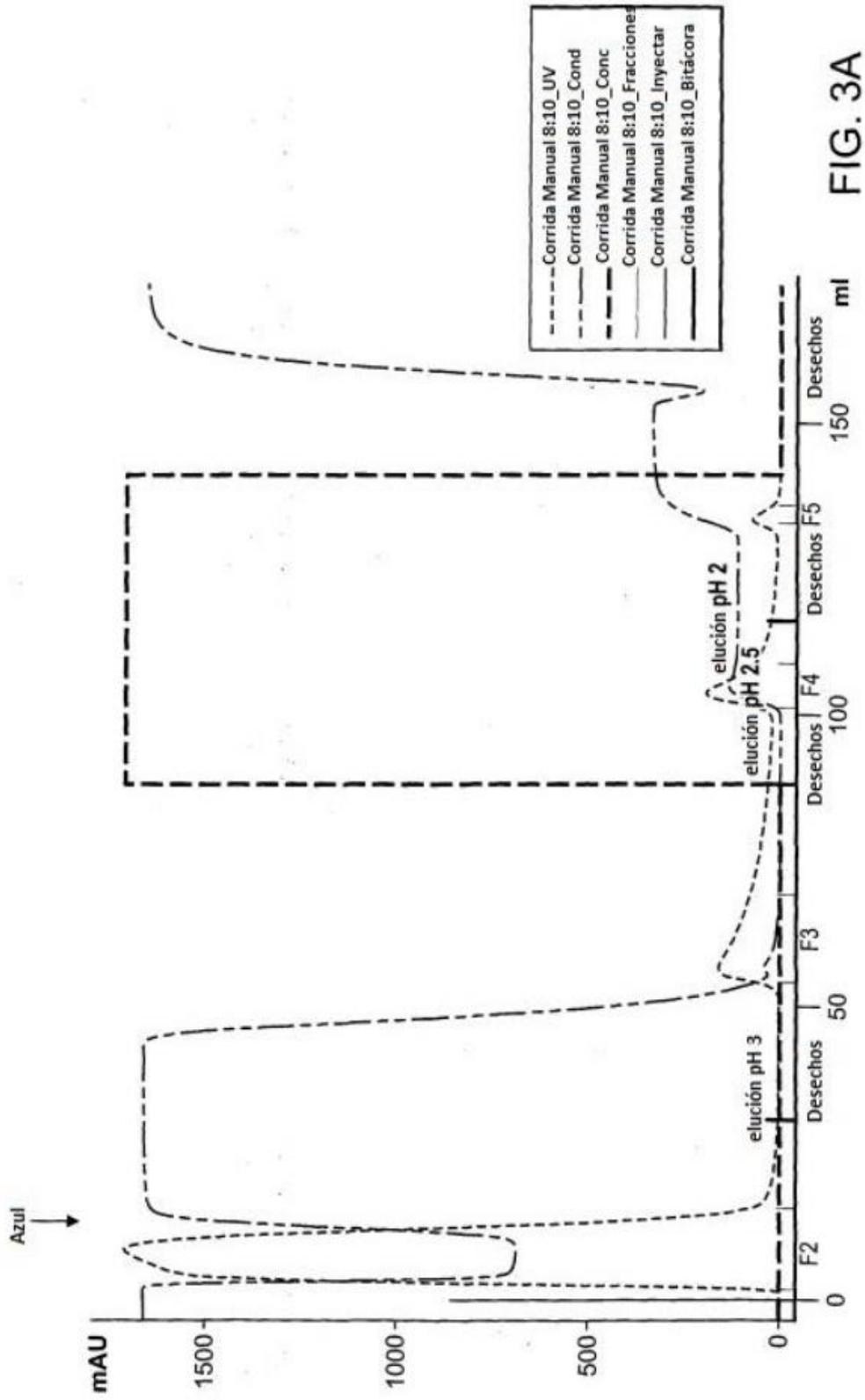


FIG. 3A

- 1: Fracción eluida pH 3
- 2: Fracción eluida pH 2,5
- 3: Fracción eluida pH 2,0
- 4: Marcador

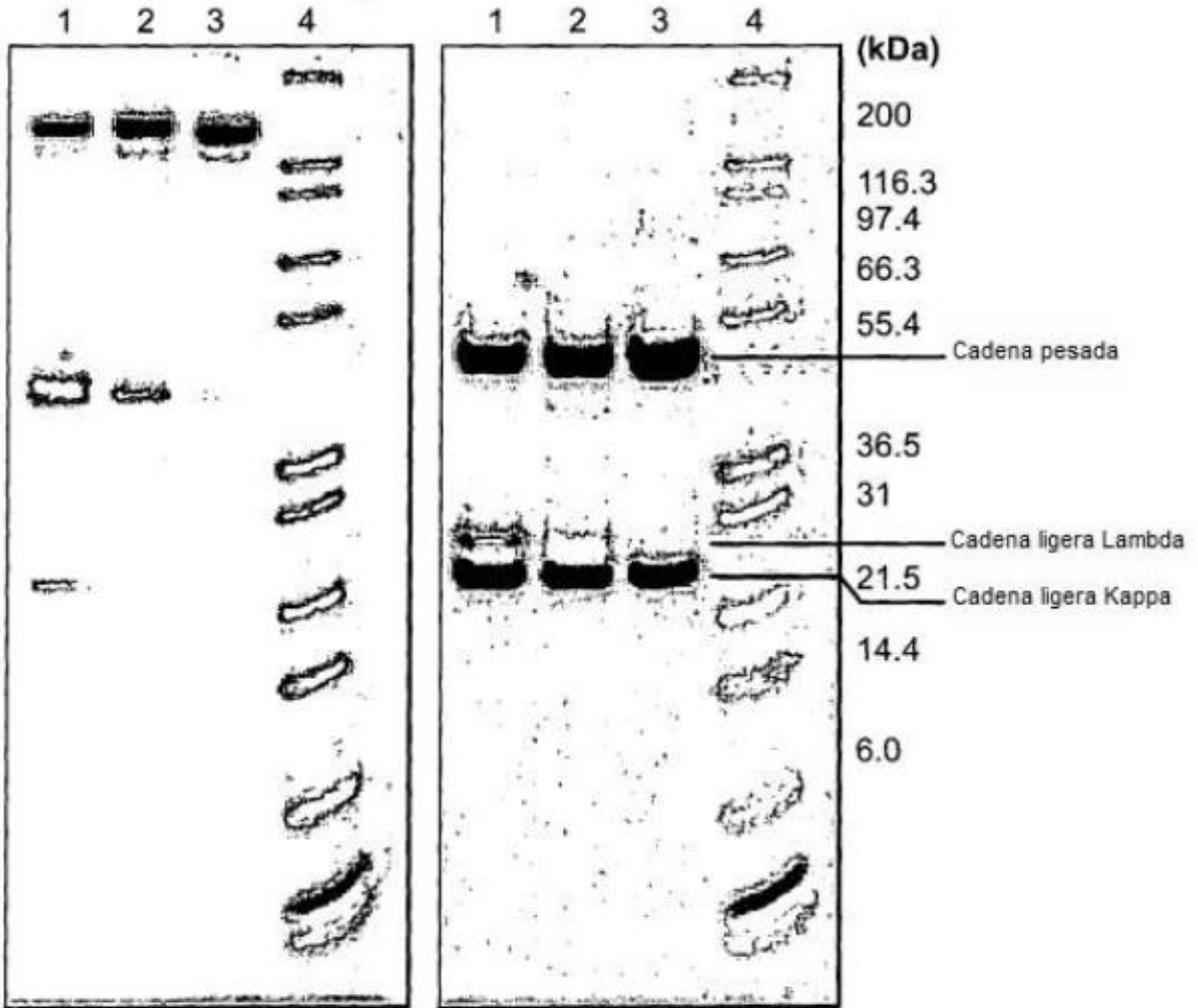


FIG. 3B

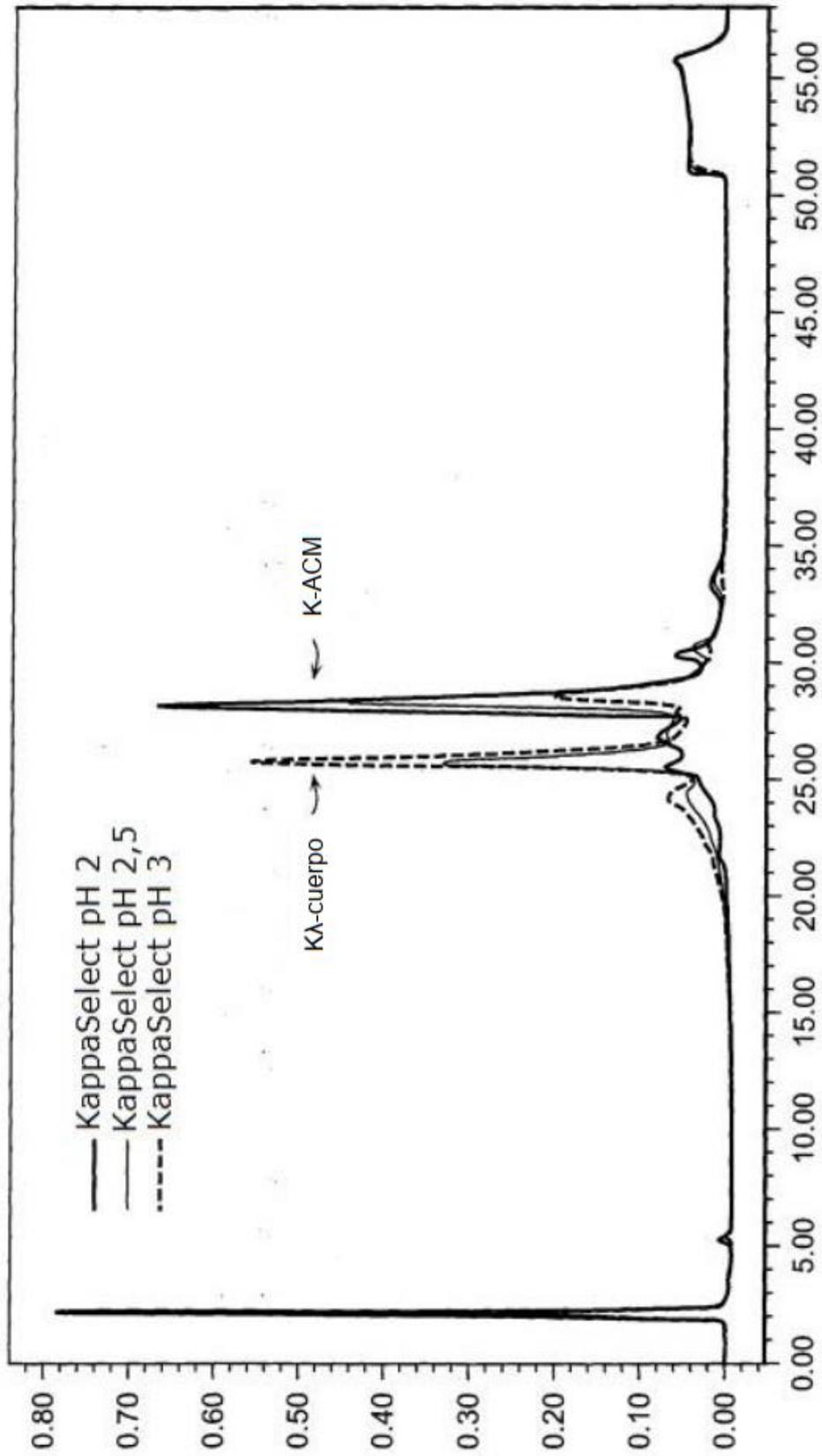


FIG. 3C

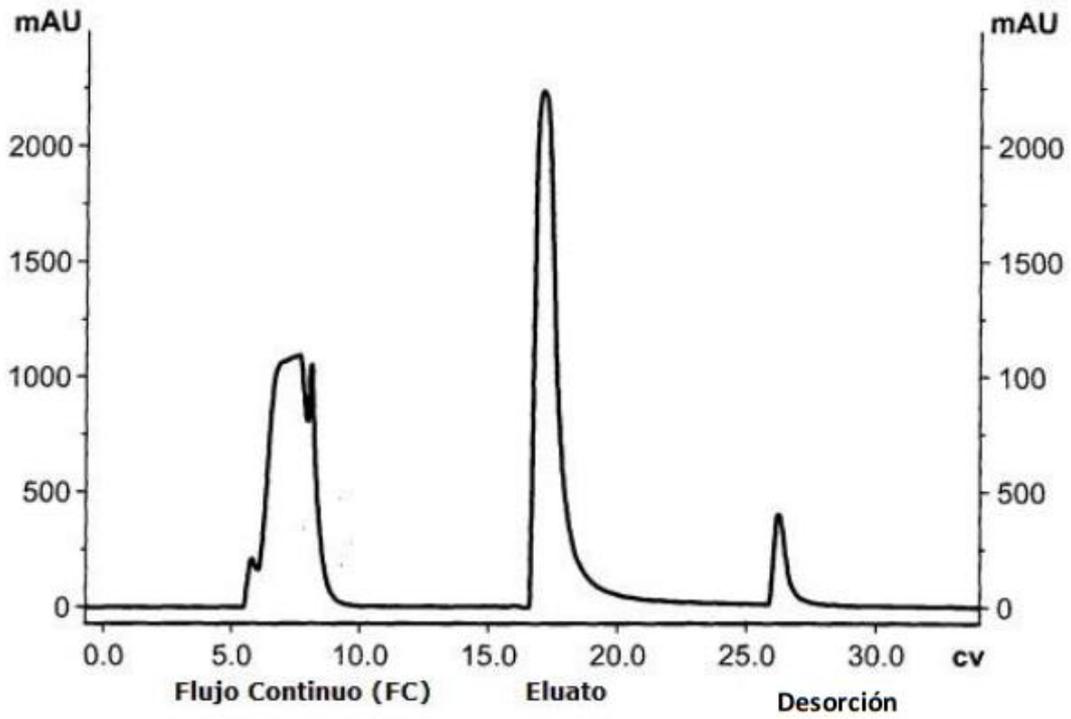


FIG. 4A

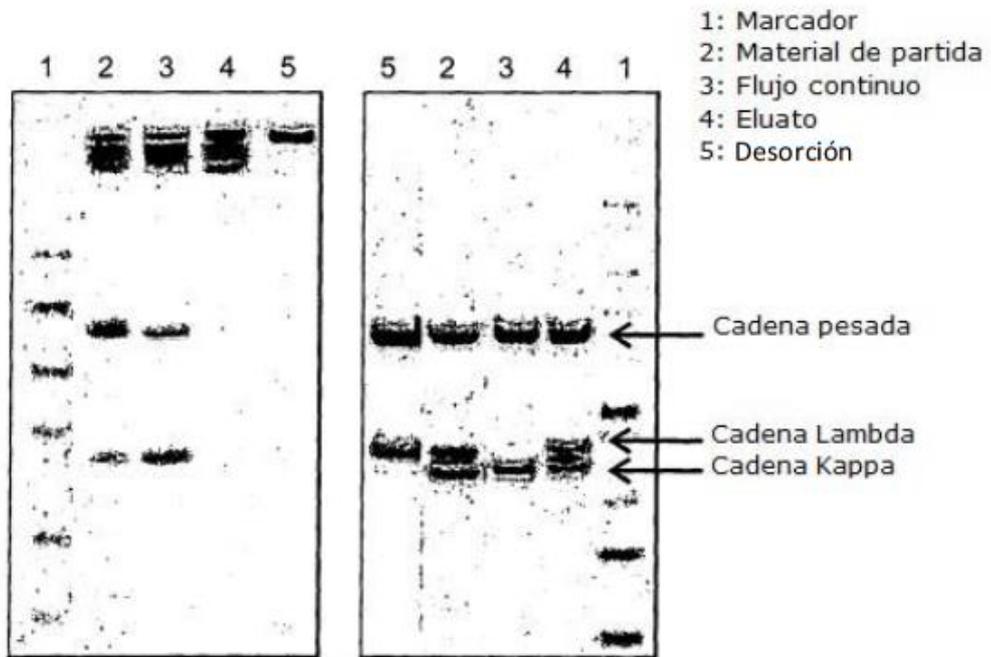


FIG. 4B

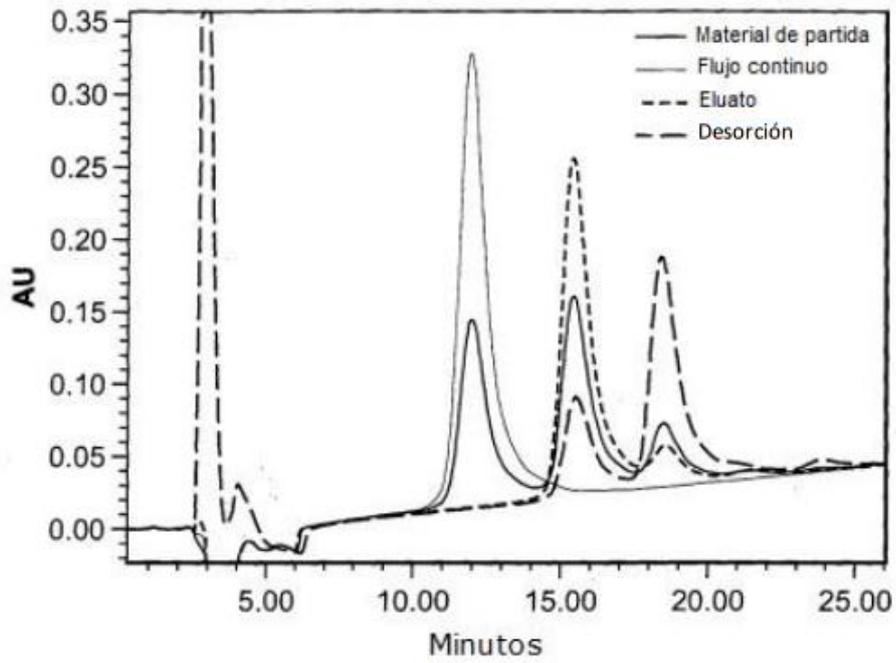


FIG. 4C

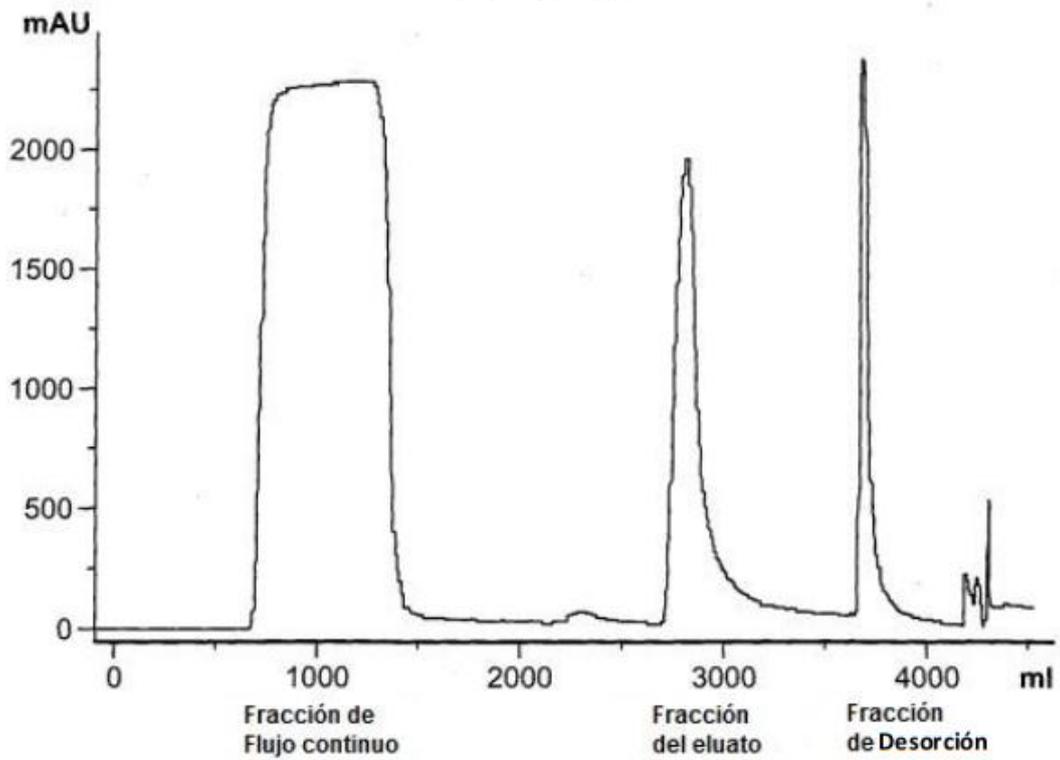


FIG. 5A

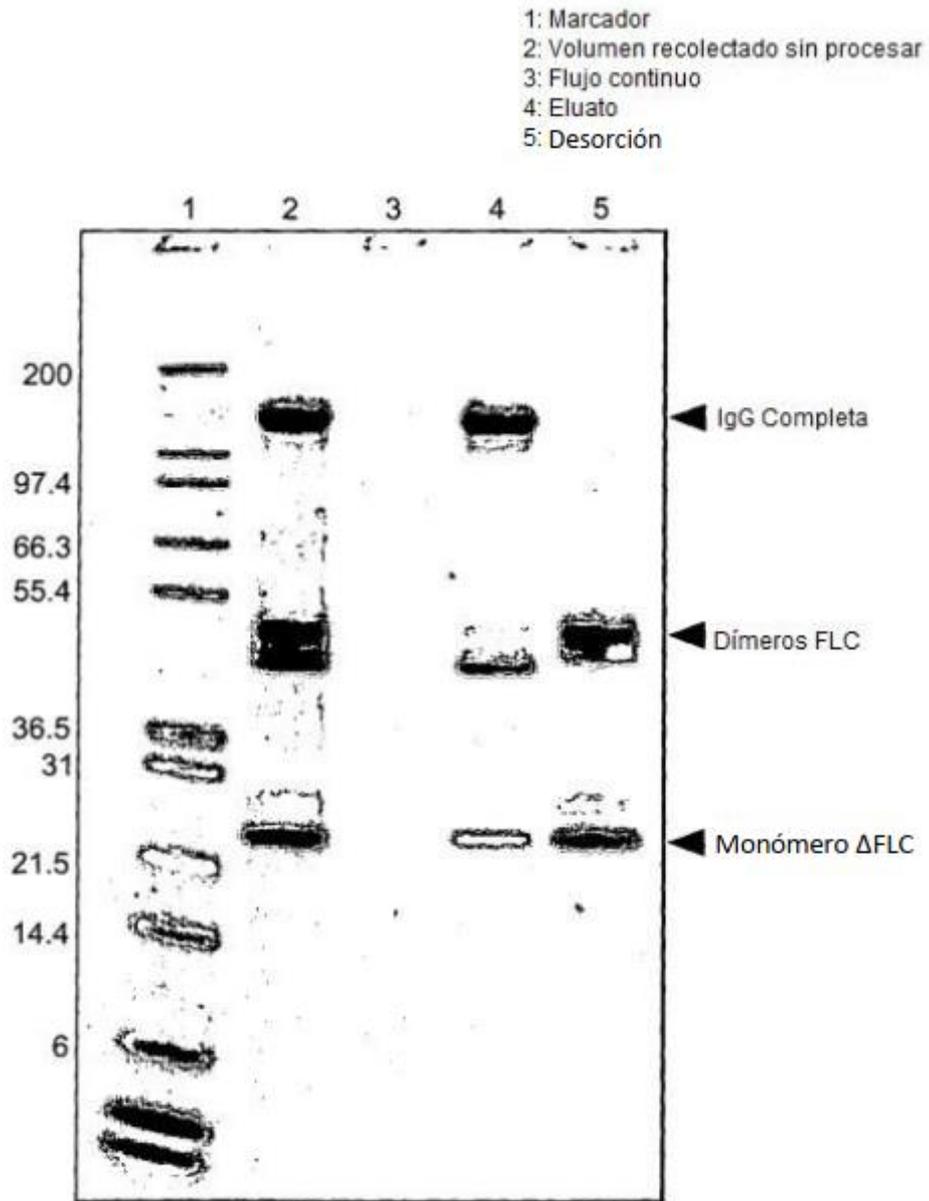


FIG. 5B

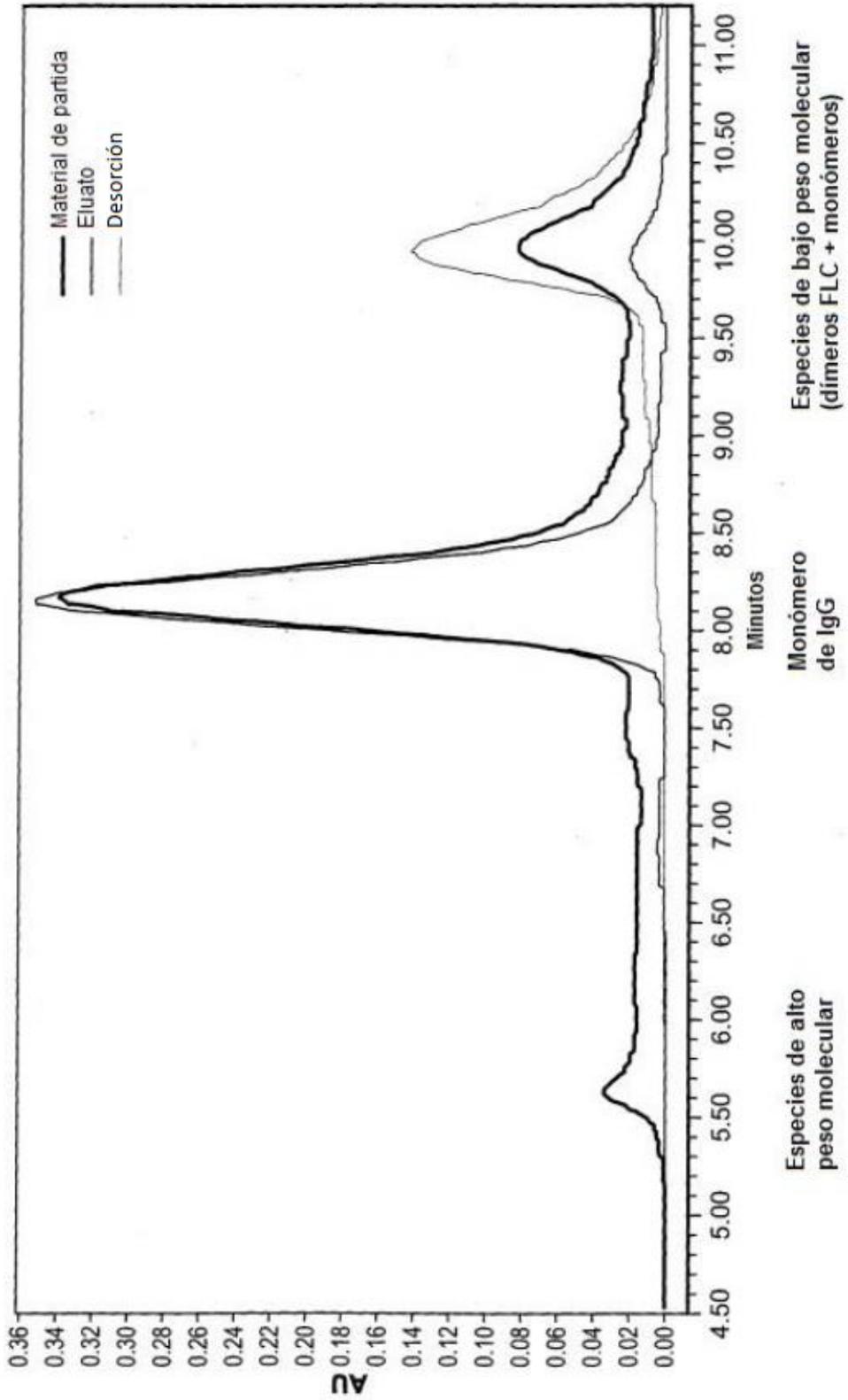


FIG. 5C