

(11) Número de Publicação: **PT 1501369 E**

(51) Classificação Internacional:

A23J 1/00 (2015.01) **C07K 1/18** (2015.01)
C07K 1/36 (2015.01) **C07K 1/34** (2015.01)
C07K 16/06 (2015.01) **C07K 16/28** (2015.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.04.25	(73) Titular(es): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridade(s): 2002.04.26 US 375953 P	1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA	US
(43) Data de publicação do pedido: 2005.02.02	94080	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.06.24 184/2015	(72) Inventor(es): FAHNER, ROBERT, LEE FOLLMAN DEBORAH BENEDICTE LEBRETON REIS, ROBERT, VAN	US US US US
	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM BASE NA NÃO AFINIDADE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE ENVOLVE A COMBINAÇÃO DE CROMATOGRAFIA DE NÃO AFINIDADE COM A HPTFF

RESUMO

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM BASE NA NÃO AFINIDADE

A presente invenção refere-se a um método de purificação de proteínas que envolve a combinação de cromatografia de não afinidade com a HPTFF.

DESCRIÇÃO

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM BASE NA NÃO AFINIDADE

Antecedentes da Invenção

Campo da invenção

Esta invenção relaciona-se de um modo geral com a purificação de proteínas. Em particular, a invenção refere-se a um método para purificar proteínas (como anticorpos e moléculas semelhantes a anticorpos, p. ex. imunoadesinas) a partir de uma composição que compreende o polipéptido e pelo menos uma impureza sem recorrer ao uso da cromatografia de afinidade.

Descrição do Estado da Arte

A purificação de proteínas em larga escala e de modo económico é cada vez mais um problema importante para a indústria biotecnológica. Geralmente, as proteínas são produzidas por cultura de células, usando linhas de células de mamífero ou bacterianas modificadas para produzir a proteína de interesse por meio da inserção de um plasmídeo recombinante contendo o gene para essa proteína. Como as linhas de células usadas são organismos vivos, têm de ser alimentadas com um meio de cultura complexo, que contém açúcares, aminoácidos e fatores de crescimento, geralmente fornecidos a partir de preparações de soro animal. A separação da proteína desejada da mistura dos compostos fornecidos às células e dos subprodutos das próprias células de modo a se obter uma pureza suficiente para a utilização em terapêuticas para seres humanos constitui um enorme desafio.

Procedimentos para a purificação de proteínas a partir dos resíduos celulares dependem, em primeiro lugar, do local de expressão da proteína. Algumas proteínas são secretadas diretamente da célula para o meio de cultura envolvente; outras são produzidas intracelularmente. No segundo caso, a primeira etapa do processo de purificação envolve a lise da célula, que

pode ser efetuada por vários métodos, incluindo cisalhamento mecânico, choque osmótico ou tratamentos enzimáticos. Essa ruptura liberta o conteúdo da célula na sua totalidade para o homogenato e, além disso, produz fragmentos subcelulares difíceis de remover devido ao seu pequeno tamanho. Estes são geralmente removidos por centrifugação ou por filtração. O mesmo problema ocorre, embora em menor escala, no caso de proteínas diretamente secretadas devido à morte natural das células e à libertação de proteínas intracelulares da célula hospedeira no decorrer do ciclo de produção de proteínas.

Quando se obtém uma solução contendo a proteína de interesse, tenta-se separar esta das outras proteínas produzidas pela célula recorrendo a uma combinação de diferentes técnicas de cromatografia. Estas técnicas separam misturas de proteínas com base na sua carga, grau de hidrofobicidade ou tamanho. Existem várias resinas de cromatografia disponíveis para cada uma dessas técnicas, permitindo uma adaptação precisa do esquema de purificação à proteína específica em questão. A base de cada um destes métodos de separação é que as proteínas se deslocam a diferentes velocidades quando descem por uma longa coluna, obtendo-se uma separação física que aumenta à medida que as proteínas avançam na coluna ou que têm uma adesão seletiva ao meio de separação, sendo depois eluídas de forma diferenciada por diferentes solventes. Nalguns casos, a proteína desejada é separada das impurezas por estas aderirem especificamente à coluna, enquanto que a proteína de interesse não adere, ou seja, a proteína de interesse está presente na fração não ligada ("flow through").

A cromatografia de troca iónica, assim designada em função do contra-íon permutável, é um procedimento aplicável à purificação de moléculas ionizáveis. As moléculas ionizadas são separadas devido à interação eletrostática não específica dos seus grupos com carga com as moléculas de carga oposta ligadas à matriz em fase sólida, retardando dessa forma essas

moléculas ionizadas que interagem mais fortemente com a fase sólida. A carga líquida de cada tipo de molécula ionizada e a sua afinidade com a matriz variam de acordo com o número de grupos com carga, a carga de cada grupo e a natureza das moléculas que competem ao nível da interação com a matriz em fase sólida com carga. Estas diferenças resultam na separação de vários tipos de moléculas por cromatografia de troca iónica. Na purificação de proteínas típica com cromatografia de troca iónica, carrega-se numa coluna de troca iónica uma mistura de muitas proteínas derivada de uma célula hospedeira, como numa cultura de células de mamífero. Depois de as moléculas não ligadas serem eliminadas na lavagem, ajustam-se as condições, por exemplo, mudando o pH, a concentração do contra-íão e afins usando o modo por etapas ou por gradiente, para libertar da fase sólida uma proteína de interesse ionizada retida ou retardada de forma não específica e separá-la das proteínas com diferentes características ao nível da carga. A cromatografia de troca aniónica envolve a competição de uma molécula de interesse aniónica com o contra-íão negativo pela interação com uma molécula com carga positiva ligada à matriz de fase sólida a um pH e sob as condições de um determinado processo de separação. Em contraste, a cromatografia de troca catiónica envolve a competição de uma molécula de interesse catiónica com o contra-íão positivo por uma molécula com carga negativa ligada à matriz de fase sólida a um pH e sob as condições de um determinado processo de separação. A cromatografia de troca iónica multimodal envolve a utilização de uma combinação, na mesma etapa, de meios cromatográficos de troca aniónica e catiónica. Em particular, "multimodal" refere-se a uma matriz em fase sólida à qual está ligada covalentemente uma mistura de grupos de troca catiónica, troca aniónica e de interação hidrófoba. Um exemplo representativo de colunas de troca iónica multimodal disponíveis comercialmente é a ABx™, cuja utilização é descrita nos Exemplos.

A aplicação de cromatografia com hidroxiapatite a

proteínas envolve a interação não específica dos grupos carboxilato ou amino carregados de uma proteína com os grupos de carga opostos da hidroxiapatite, em que a carga líquida da hidroxiapatite e da proteína é controlada pelo pH do tampão. A eluição é alcançada por deslocamento do emparelhamento não específico da proteína com a hidroxiapatite, usando-se íons como Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Os grupos da proteína carregados negativamente são deslocados por compostos de carga negativa, como fosfatos, levando dessa forma à eluição da proteína com uma carga efetiva negativa.

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) é útil na purificação e separação de moléculas, como proteínas, com base nas diferenças na hidrofobicidade da sua superfície. Os grupos hidrofóbicos de uma proteína interagem de modo não específico com grupos hidrofóbicos acoplados à matriz usada na cromatografia. Diferenças no número e natureza dos grupos hidrofóbicos na superfície da proteína resultam numa progressão diferencial mais lenta numa coluna de HIC, conduzindo, dessa forma, à separação de proteínas numa mistura de proteínas.

A cromatografia de interação hidrofóbica induzida por carga (HCI) é útil na separação de moléculas biológicas, como proteínas, com base no comportamento dependente do pH de ligandos bimodais ionizáveis (Boschetti, E. et al., *Genetic Engineering News* 20(13) (2000)). A pH neutro, o ligando não tem carga e liga-se a uma proteína de interesse através de uma interação não específica ligeiramente hidrofóbica. Ao se reduzir o pH durante a aplicação de um gradiente de tampão, o ligando fica com carga positiva e a ligação hidrofóbica quebra-se devido à repulsão da carga eletrostática (Boschetti, E. (2000), *supra*). As condições pouco agressivas usadas na HCI diminuem o risco de desnaturação das proteínas e de agregação de anticorpos.

A cromatografia de afinidade, que explora uma interação específica estruturalmente dependente (i.e., espacialmente

complementar) entre a proteína a ser purificada e uma agente de captura imobilizado, é uma opção padrão para a purificação de algumas proteínas, como anticorpos. A proteína A, por exemplo, é um adsorvente útil na cromatografia de afinidade aplicada a proteínas, como anticorpos, que contêm uma região Fc. A proteína A é uma proteína de 41kD da parede celular de *Staphylococcus aureus* que se liga com uma afinidade elevada (cerca de 10^{-8} M para a IgG humana) à região Fc dos anticorpos. Apesar da sua utilização frequente, a cromatografia de afinidade é onerosa, particularmente à escala industrial necessária para purificar proteínas terapêuticas.

A filtração por fluxo tangencial de desempenho elevado (HPTFF, do inglês *high-performance tangential-flow filtration*) é uma tecnologia à base de membranas útil na separação de misturas de proteínas sem limite em relação ao seu tamanho relativo (Zydney, A.L. e van Reis, R., High-Performance Tangential-Flow Filtration, cap. 10, in Membrane Reparatons in Biotechnology, 2^a ed., William K. Wang, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, NY (2001), pp. 277-298; van Reis et al. Journal of Membrane Science 159(1999) 133-142, van Reis, R. et al. Biotechnol. Bioeng. 56:71-82 (1997); e van Reis, R., US 5 256 694, US 5 256 294, US 5 490 937, e US 6 054 051). A HPTFF pode ser usada ao longo de processos de purificação a jusante para remover impurezas específicas (como proteínas, ADN, ou endotoxinas), eliminar viroses, e/ou eliminar oligômeros de proteínas ou produtos de degradação. A HPTFF é um método único entre as tecnologias de separação na medida em que pode efetuar simultaneamente purificação, concentração e troca de tampão, possibilitando a combinação de diferentes etapas de separação numa única operação unitária escalável.

Apesar destes métodos avançados de cromatografia e filtração, a cromatografia de afinidade é geralmente usada como uma etapa de captura para cumprir os requisitos de pureza, rendimento e produtividade da purificação de anticorpos para fins farmacêuticos. O custo elevado e a instabilidade dos meios

de afinidade, porém, aumenta o custo final das terapêuticas com anticorpos, em particular as que requerem doses elevadas e/ou administração crónica. Além disso, frequentemente, não se consegue alcançar a pureza adequada, a não ser que se combine várias etapas de purificação, aumentando dessa forma o custo e reduzindo o rendimento do produto. Nos Estados Unidos, os anticorpos representam uma percentagem cada vez maior dos produtos terapêuticos existentes no mercado e em fase de desenvolvimento para o tratamento, por exemplo, de cancro, doença autoimune, doença infecciosa, doença cardiovascular e rejeição de transplantes ((Stratan, F. et al., *Monoclonal Antibodies - Coming of Age*, 1 (2001), e Booth, M. et al., *Monoclonal Antibodies: Targeting the Issues*, 1 (2001)). Por conseguinte, existe uma necessidade de processos para purificar proteínas terapêuticas ou outros compostos polipeptídicos que recorrem a menos etapas e que não precisem de uma etapa onerosa de separação por afinidade.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se à surpreendente descoberta de que um processo de purificação cromatográfica de não afinidade combinado com a HPTFF é capaz de purificar uma proteína alvo, como um anticorpo ou uma molécula semelhante a um anticorpo, presente numa mistura que contém proteínas da célula hospedeira de modo a que as impurezas de proteínas da célula hospedeira presentes na proteína alvo purificada se encontrem numa quantidade inferior a 100 partes por milhão (ppm).

Num aspeto, a invenção refere-se a um método para purificar uma proteína alvo presente numa mistura que contém proteína da célula hospedeira e opcionalmente outras impurezas, que compreende duas etapas de purificação por não afinidade seguidas de uma filtração de fluxo tangencial de desempenho elevado (HPTFF), na ausência de uma etapa de cromatografia de afinidade, em que esse método produz uma proteína alvo purificada contendo menos do que 100 partes por

milhão (ppm) de proteína da célula hospedeira, em alternativa, menos do que 90 ppm, menos do que 80 ppm, menos do que 70 ppm, menos do que 60 ppm, menos do que 50 ppm, menos do que 40 ppm, menos do que 30 ppm, menos do que 20 ppm, menos do que 10 ppm, menos do que 5 ppm, ou menos do que 3 ppm.

A primeira etapa de purificação por não afinidade consiste numa cromatografia de troca catiónica e a dita segunda etapa de purificação por não afinidade é uma cromatografia de troca aniónica. Numa forma de realização preferida, o método da invenção consiste em duas etapas de purificação por cromatografia de não afinidade seguidas de HPTFF e, a seguir, de uma etapa de isolamento, excluindo-se quaisquer outras etapas de purificação.

A proteína alvo a ser purificada pode ser qualquer proteína, em particular uma proteína recombinante produzida em qualquer célula hospedeira, incluindo, mas sem que isso constitua uma limitação, células de ovário de hamster chinês (CHO). Proteínas alvo ideais são anticorpos, imunoadesinas e outras moléculas semelhantes a anticorpos, como proteínas de fusão que incluam uma região C_H2/C_H3.

Estas e outras formas de realização não limitantes da presente invenção são facilmente compreendidas por especialistas na área após terem lido o presente documento e as reivindicações aqui apresentadas. Deverá ficar claro que esta invenção não se limita às composições de matérias e processos particulares descritos, uma vez que esses compostos e métodos podem, obviamente, variar. Deverá ficar igualmente claro que a terminologia usada no presente documento destina-se apenas a descrever formas de realização particulares.

Descrição Resumida das Figuras

A FIGURA 1 apresenta um diagrama esquemático de uma configuração de filtração para as experiências de HPTFF.

A FIGURA 2 apresenta um gel de poliacrilamida corado com prata (Zaxis 10-20%), o qual contém amostras que foram obtidas a diferentes intervalos durante a purificação de anticorpo

rhuMAb anti-HER2 e que foram submetidas a análise por SDS-PAGE. As setas que indicam 60 kD, 50 kD, e 25 kD apontam para o anticorpo completo, a cadeia pesada, e a cadeia leve, respectivamente. As outras bandas correspondem a fragmentos de rhuMAb anti-HER2. As amostras incluíram um padrão de peso molecular (pista 1), rhuMAb de referência obtido por meio de um processo de purificação por afinidade (pistas 2 e 7), uma amostra do líquido colhido da cultura de células (HCCF, do inglês *harvested cell culture fluid*) contendo rhuMAb (pista 3) antes da purificação, e amostras do material recuperado, após cromatografia S (pista 4), após cromatografia Q (pista 5), após a HPTFF adicional (pistas 6 e 12), após a Experiência 1 de HPTFF com uso de CRC100+ (pista 9), após a Experiência 1 de HPTFF com uso de CRC300+ (pista 10), e após a Experiência 2 de HPTFF (pista 11).

FIGURAS 3A e 3B. A FIGURA 3A apresenta a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo rhuMAb anti-HER2; A FIGURA 3B apresenta a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo rhuMAb anti-HER2.

FIGURAS 4A e 4B. A FIGURA 4A apresenta a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo rhuMAb anti-CD11a; A FIGURA 4B apresenta a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo rhuMAb anti-CD11a.

A FIGURE 5 apresenta um gel de SDS-PAGE corado com prata o qual contém amostras obtidas em diferentes momentos durante a purificação do anticorpo monoclonal recombinante humano (rhuMAb) anti-CD40

Descrição Detalhada das Formas de Realização

A. Definições

O termo "anticorpo" é usado no sentido mais amplo e abrange especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos completos), anticorpos policlonais, anticorpos multi-específicos (p. ex., anticorpos bi-específicos), e fragmentos de anticorpos desde que retenham ou tenham sido modificados de modo a conter o domínio de ligação específico

ao ligando. O anticorpo da presente invenção é dirigido contra um "antigénio" de interesse. De preferência, o antigénio é um polipéptido biologicamente importante e a administração do anticorpo a um mamífero que sofra de uma doença ou um distúrbio pode resultar num benefício terapêutico para esse mamífero. Porém, também se abrange anticorpos dirigidos contra antigénios não polipeptídicos (como antigénios glicolipídicos associados a tumores; veja-se a Patente US 5 091 178). Quando o antigénio é um polipéptido, pode ser uma molécula transmembranar (p. ex., um recetor) ou um ligando, como um fator de crescimento. Antigénios exemplificativos incluem os polipéptidos acima referidos. Alvos moleculares preferidos para anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem polipéptidos CD como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, e CD40; membros da família de recetores HER como o recetor EGF, recetor HER2, HER3 ou HER4; molécula de adesão celular como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3 incluindo as suas subunidades a ou b (p. ex. anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento como VEGF; IgE; antigénios eritrocitários; recetor flk2/flt3; recetor de obesidade (OB); recetor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C, etc. Antigénios solúveis ou seus fragmentos, opcionalmente conjugados com outras moléculas, podem ser usados como imunogénios para produzir anticorpos. No caso de moléculas transmembranares, como os recetores, pode usar-se fragmentos destas (p. ex. o domínio extracelular de um recetor) como imunogénios. Em alternativa, pode usar-se como imunogénio as células que expressam a molécula transmembranar. Essas células podem ser derivadas de uma fonte natural (p. ex. linhas de células cancerosas) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula transmembranar.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem a porção de um anticorpo completo, geralmente a sua região de ligação ao antigénio ou região variável. Exemplos de fragmentos de

anticorpos incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; moléculas de anticorpos de cadeia única; *diabodies*; anticorpos lineares; e anticorpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

O termo "anticorpos monoclonal" conforme é usado no presente documento refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, *i.e.*, os anticorpos individuais que compõem a população são idênticos exceto no caso de mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas. Os anticorpos monoclonais são extremamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos (policlonais) convencionais que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio. O modificador "monoclonal" indica o carácter da anticorpo como tendo sido obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a ser usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método do hibridoma inicialmente descrito por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), ou por métodos de ADN recombinante (veja-se, *p. ex.*, Patente US 4 816 567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos apresentados em fagos (*phage display*) usando as técnicas descritas por Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por exemplo.

Os anticorpos monoclonais no presente documento incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) em que uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse particular de anticorpos, enquanto que o resto da(s) cadeia(s)

é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie particular ou pertencentes a uma outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como a fragmentos desses anticorpos, desde que estes exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4 816 567; e Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

O termo "região hipervariável" quando utilizado no presente documento refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antigénio. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (*i.e.* resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou os resíduos de uma "ansa (*loop*) hipervariável" (*i.e.* resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Resíduos "Framework" ou "FR" consistem nos resíduos do domínio variável que não são os resíduos da região hipervariável de acordo com o que foi aqui definido.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (*p. ex.*, murinos) consistem em anticorpos quiméricos que contém uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Na maior parte dos casos, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) em que os resíduos da região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos da região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) como um ratinho, rato, coelho ou um primata não humano que tenha a especificidade, afinidade e capacidade desejada. Nalguns casos, resíduos da região *framework* (FR) Fv são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados

podem conter resíduos que não existem no anticorpo recipiente ou no anticorpo dador. Estas alterações são efetuadas para se melhorar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá conter substancialmente a totalidade de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as ansas hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são de uma sequência de imunoglobulina humana. Opcionalmente, o anticorpo humanizado irá também conter pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente da imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja-se Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Conforme se utiliza no presente documento, o termo "imunoadesina" designa moléculas semelhantes a anticorpos que combinam o "domínio de ligação" de uma proteína "adesina" heteróloga (p. ex. um recetor, um ligando, ou uma enzima) com as funções efectoras de um domínio constante de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem a fusão da sequência de aminoácidos da adesina com a especificidade de ligação desejada que é diferente do local de ligação e de reconhecimento do antigénio (local de ligação ao antigénio) de um anticorpo (*i.e.* é "heteróloga") e uma sequência do domínio constante da imunoglobulina. A sequência do domínio constante da imunoglobulina na imunoadesina é derivada das cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ uma vez que as imunoadesinas que contêm estas regiões podem ser purificadas por cromatografia com Proteína A (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)).

O termo "domínio de ligação a ligando" conforme é utilizado no presente documento refere-se a qualquer recetor nativo na superfície celular ou qualquer sua região ou seu derivado que retenha pelo menos uma ligação ao ligando qualitativa de um recetor correspondente nativo. Numa forma de realização específica, o recetor é proveniente de um

polipéptido de superfície celular com um domínio extracelular que é homólogo a um membro da super família de genes das imunoglobulinas. Outros recetores, que não são membros da super família de genes das imunoglobulinas mas que são, porém, abrangidos por esta definição incluem os recetores de citocinas, e em particular recetores com atividade tirosina cinase (recetores tirosina cinase), membros das superfamílias de recetor de fator de crescimento nervoso e hematopoiético, e moléculas de adesão celular, p. ex. selectinas (E, L e P).

O termo "domínio de ligação ao recetor" é usado para designar qualquer ligando nativo de um recetor, incluindo moléculas de adesão celular ou qualquer região ou derivado desse ligando nativo que retenha pelo menos uma capacidade de ligação ao recetor qualitativa de um ligando nativo correspondente. Esta definição, entre outras, inclui especificamente sequências de ligação de ligandos dos recetores acima mencionados.

Uma "quimera anticorpo-imunoadesina" contém uma molécula que combina pelo menos um domínio de ligação de um anticorpo (conforme definido no presente documento) com pelo menos uma imunoadesina (conforme definido neste pedido de patente). Quimeras de anticorpo-imunoadesinas exemplificativas são as quimeras bi-específicas CD4-IgG descritas em Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) e Chamow et al., J. Immunol. 153:4268 (1994).

Salvo indicação em contrário, o termo "HER2" quando utilizado no presente documento refere-se à proteína HER2 humana e "HER2" refere-se ao gene *HER2* humano. O gene *HER2* humano e a proteína HER2 humana são descritos em Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (número de acesso do Genebank X03363), por exemplo.

"Trastuzumab", "HERCEPTIN®", " rhuMab anti-HER2", e "HER2" são usados de forma equivalente no presente documento para se referir a um anticorpo anti-HER2 humanizado que

compreende a sequência de aminoácidos da cadeia leve da SEQ ID NO:1 e a sequência de aminoácidos da cadeia pesada da SEQ ID NO:2 ou suas variantes da sequência de aminoácidos que retenham a capacidade de ligação a HER2 e de inibição do crescimento de células tumorais que sobre-expressam HER2 (Figuras 3A e 3B; veja-se também a Patente US 5 677 171).

"rhuMab anti-CD11a " ou "CD11a" " são usados de forma equivalente no presente documento para se referir a uma anticorpo anti-CD11a humanizado que compreende a sequência de aminoácidos da cadeia leve da SEQ ID NO:3 e a sequência de aminoácidos da cadeia pesada da SEQ ID NO:4 ou suas variantes da sequência de aminoácidos que retenham a capacidade de ligação a LFA-1 e de inibição de determinadas funções imunes dependentes das células T (Figuras 4A e 4B; veja-se também a Patente US 5 622 700; WO 98/23761; Steppe et al., *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991); e Hourmant et al., *Transplantation* 58:377-380 (1994)). Os anticorpos anti-CD11a incluem ainda, p. ex., MHM24 [Hildreth et al., *Eur. J. Immunol.*, 13: 202-208 (1983)], R3.1 (IgG1) [R. Rothlein, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT], 25-3 (ou 25.3), uma IgG1 disponível na Immunotech, França [Olive et al., in Feldmann, ed., *Human T cell Clones. A new Approach to Immune Regulation*, Clifton, NJ, Humana, 1986 p. 173], KBA (IgG2a) [Nishimura et al., *Cell. Immunol.*, 107: 32 (1987); Nishimura et al., *ibid.*, 94: 122 (1985)], M7/15 (IgG2b) [Springer et al., *Immunol. Rev.*, 68: 171 (1982)], IOT16 [Vermot Desroches et al., *Scand. J. Immunol.*, 33: 277-286 (1991)], SPVL7 [Vermot Desroches et al., *supra*], e M17 (IgG2a), disponível na ATCC, que são anticorpos de rato anti-CD11a murino. Anticorpos anti-CD11a preferidos são os anticorpos humanizados descritos na Patente US 6 037 454. Também se prefere em geral que os anticorpos anti-CD11a não sejam anticorpos que causam a depleção de células T, ou seja, que a administração do anticorpo anti-CD11a não reduza os níveis de células T circulantes.

A "composição" a ser purificada no presente documento

compreende o polipéptido de interesse e uma ou mais impurezas. A composição pode ser "parcialmente purificada" (*i.e.* tendo sido submetida a uma ou mais etapas de purificação, como por cromatografia de não afinidade descrita no presente documento ou pode ser obtida diretamente a partir de uma célula hospedeira ou organismo hospedeiro que produzam o polipéptido (p. ex. a composição pode compreender a líquido colhido da cultura de células).

Conforme se utiliza no presente documento "polipéptido" refere-se de um modo geral a péptidos e proteínas com mais de cerca de dez aminoácidos. Preferencialmente, o polipéptido é uma proteína de mamífero, exemplos da qual incluem renina; uma hormona de crescimento humana; hormona de crescimento bovina; fator de libertação da hormona de crescimento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora da tiróide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A da insulina; cadeia B da insulina; proinsulina; hormona estimuladora do folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagon; fatores de coagulação como fator VIIIC, fator IX, fator tecidual; fator de von Willebrands; fatores anti-coagulação como Proteína C; fator natriurético atrial; surfatante pulmonar: um ativador do plasminogénio do tipo urocinase ou urina humana ou ativador do plasminogénio do tipo tecidual (t-PA); bombesina; trombina, fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase, RANTES (regulada sob ativação, normalmente expresso e secretado por células T); proteína inflamatória de macrófagos humana (MIP-1-alfa); uma albumina sérica como albumina sérica humana; substância inibidora Muelleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorelaxina; péptido associado à gonadotropina de ratinho; uma proteína microbiana, como uma beta-lactamase; ADNase; IgE; antigénio associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA), como CTLA-4; inibina; ativina; factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); recetores de hormonas ou fatores de crescimento; Proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator

neurotrófico como fator neurotrófico derivado do osso (BDNF); neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento nervoso como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF) como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I no cérebro), proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP); proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, e CD40; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogenética do osso (BMP); um interferão como interferão-alfa, -beta, e -gama; fatores estimuladores de colónias (CSF), p. ex., M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (IL), e.g., de IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; recetores de células T; proteínas de superfície da membrana; fator de aceleração de decaimento; antigénio viral como, por exemplo, uma porção do invólucro do vírus da SIDA; proteínas de transporte; recetores de endereçamento (*homing*); adressinas; proteínas reguladoras; integrinas como CD11a, CD11b, CD 11 c, CD18, uma ICAM, VLA-4 e VCAM; um antigénio associado a tumor como o recetor HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos e/ou variantes de qualquer um dos polipéptidos acima mencionados. Além disso, uma proteína ou polipéptido da invenção é um anticorpo, um seu fragmento ou variante, que se liga especificamente a qualquer um dos polipéptidos acima mencionados.

Uma "impureza" consiste num material que é diferente do produto polipeptídico desejado ou proteína de interesse. A impureza inclui, mas sem que isso constitua uma limitação, uma proteína da célula hospedeira (HCP, como CHOP), um polipéptido que não seja o polipéptido alvo, ácido nucleico, endotoxina etc.

Uma "variante acídica" é uma variante de um polipéptido

de interesse que é mais acídica (p. ex. conforme determinado por cromatografia de troca catiónica) do que o polipéptido de interesse. Um exemplo de uma variante acídica é uma variante desamidada.

Os termos "proteína de interesse" e "proteína alvo" são utilizados de forma equivalente e referem-se a uma proteína ou polipéptido como um anticorpo (conforme definido no presente documento) que se destina a ser purificado por um método da invenção a partir de uma mistura de proteínas e, opcionalmente, de outros materiais como resíduos celulares e afins.

Os termos "proteína de células do ovário de hamster chinês" e "CHOP" são utilizados de forma equivalente para referir uma mistura de proteínas da célula hospedeira ("HCP") derivada da cultura de células do ovário de hamster chinês ("CHO"). A HCP ou CHOP está geralmente presente como uma impureza num meio ou lisado de cultura de células (p. ex., um líquido colhido da cultura de células ("HCCF")) que compreende uma proteína de interesse como um anticorpo ou uma imunoadesina expressos numa célula CHO). A quantidade da CHOP presente na mistura que compreende a proteína de interesse constitui uma medida do grau de pureza da proteína de interesse. A HCP ou CHOP inclui, mas sem que isso constitua uma limitação, uma proteína de interesse expressa pela célula hospedeira, como uma célula hospedeira CHO. Tipicamente, a quantidade da CHOP numa mistura de proteínas é expressa em partes por milhão em relação à quantidade de proteína de interesse na mistura. Deve ficar claro que quando a célula hospedeira é outro tipo de células de mamífero, uma *E. coli*, uma levedura, uma célula de inseto, ou uma célula vegetal, HCP refere-se às proteínas, que não sejam a proteína alvo, presentes num lisado da célula hospedeira.

Os termos "partes por milhão" ou "ppm" são usados de forma equivalente no presente documento para referir uma medida da pureza da proteína de interesse purificada por um método da invenção. As unidades ppm referem-se à quantidade de HCP ou CHOP em nanogramas/mililitro por proteína de interesse em

miligramas/mililitro (i.e., $\text{CHOP} = (\text{CHOP ng/ml}) / (\text{proteína de interesse mg/ml})$), sendo que as proteínas se encontram numa solução. Quando as proteínas são desidratadas (p. ex., por liofilização), ppm refere-se a $(\text{CHOP ng}) / (\text{proteína de interesse mg})$.

Por "purificação" de um polipéptido de uma composição que compreende o polipéptido e uma ou mais impurezas entende-se aumentar o grau de pureza do polipéptido na composição por meio da remoção (completa ou parcial) de pelo menos uma impureza da composição. De acordo com a presente invenção, a purificação é efetuada sem se recorrer a uma etapa de cromatografia de afinidade. Uma "etapa de purificação" pode ser parte de um processo geral de purificação que resulta numa composição "homogénea", um termo que é usado no presente documento para se referir a uma composição que compreende menos do que 100 ppm de HCP numa composição que compreende a proteína de interesse, em alternativa menos do que 90 ppm, menos do que 80 ppm, menos do que 70 ppm, menos do que 60 ppm, menos do que 50 ppm, menos do que 40 ppm, menos do que 30 ppm, menos do que 20 ppm, menos do que 10 ppm, menos do que 5 ppm, ou menos do que 3 ppm.

Os termos "Proteína A" e "ProA" são usados de forma equivalente no presente documento e abrangem Proteína A obtida de uma fonte nativa da mesma, Proteína A produzida sinteticamente (p. ex. por síntese peptídica ou técnicas recombinantes), e suas variantes que retenham a capacidade para se ligar a proteínas que tenham uma região $\text{C}_{\text{H}2}/\text{C}_{\text{H}3}$, como uma região Fc. A Proteína A pode ser adquirida comercialmente na Repligen, Pharmacia & Fennatech. A Proteína A é geralmente imobilizado num material de suporte em fase sólida. O termo "ProA" refere-se também a uma resina ou coluna de cromatografia de afinidade que contém uma matriz cromatográfica de suporte sólido à qual a Proteína A se encontra covalentemente ligada.

O termo "cromatografia" refere-se a um processo em que um soluto de interesse numa mistura é separado de outros solutos numa mistura devido a diferenças nas velocidades a que cada

soluto individual da mistura migra através de um meio estacionário sob a influência de uma fase móvel, ou em processos de ligação e eluição.

O termo "cromatografia de afinidade" e "cromatografia de afinidade para proteínas" são usados de forma equivalente no presente documento e refere-se a uma técnica de separação de proteínas em que uma proteína de interesse ou anticorpo de interesse se liga de forma específica e reversível a um ligando bio-específico. Preferencialmente, o ligando bio-específico está covalentemente ligado a uma material cromatográfico em fase sólida e está acessível à proteína de interesse na solução à medida que a solução entra em contacto com o material cromatográfico em fase sólida. A proteína de interesse (p. ex., anticorpo, enzima, ou proteína recetora) retêm a sua afinidade de ligação específica para o ligando bio-específico (antigénio, substrato, cofator, ou hormona, por exemplo) durante as etapas cromatográficas, enquanto que outros solutos e/ou proteínas na mistura não se ligam de modo considerável ou específico ao ligando. A ligação da proteína de interesse ao ligando immobilizado permite a passagem das proteínas contaminantes ou impurezas proteicas através do meio cromatográfico enquanto que a proteína de interesse permanece especificamente ligada ao ligando immobilizado no material da fase sólida. A proteína de interesse especificamente ligada é então removida na forma ativa do ligando immobilizado recorrendo-se a pH baixo, pH elevado, salinidade elevada, ligando competitivo e afins, e passa através da coluna cromatográfica com o tampão de eluição, sem as proteínas contaminantes ou impurezas proteicas que passaram anteriormente através da coluna. Qualquer componente pode ser usado como um ligando para purificar a sua respetiva proteína de ligação específica, p. ex. anticorpo.

Os termos "cromatografia de não afinidade" e "purificação por não afinidade" referem-se a um processo de purificação em que não se utiliza a cromatografia de afinidade. A

cromatografia de não afinidade inclui técnicas cromatográficas que se baseiam em interações não específicas entre uma molécula de interesse (como uma proteína, p. ex. anticorpo) e uma matriz em fase sólida.

O termo "ligação específica" conforme utilizado no presente documento, por exemplo, para descrever interações entre uma molécula de interesse e um ligando ligado a uma matriz em fase sólida, refere-se à ligação geralmente reversível de uma proteína de interesse a um ligando através de uma combinação de efeitos de complementaridade espacial entre as estruturas da proteína e do ligando num local de ligação associados a forças eletrostáticas, pontes de hidrogénio, forças hidrófobas, e/ou forças de van der Waals no local de ligação. Quanto maior for a complementaridade espacial e mais forte forem as outras forças no local de ligação, maior será a especificidade de ligação de uma proteína em relação ao seu ligando específico. Exemplos não limitantes de ligação específica incluem ligação anticorpo-antígeno, ligação enzima-substrato, ligação enzima-cofator, quelação de ião metálico, ligação proteína de ligação ao ADN-ADN, interações proteína reguladora-proteína, e afins. Idealmente, na cromatografia de afinidade, a ligação específica ocorre com uma afinidade de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-8} M em solução livre.

O termo "ligação não específica" conforme utilizado no presente documento para descrever interações entre a molécula de interesse e um ligando ou outro composto ligado à matriz em fase sólida, refere-se à ligação de uma proteína de interesse ao ligando ou composto numa matriz em fase sólida através de forças eletrostáticas, pontes de hidrogénio, forças hidrófobas, e ou forças de van der Waals no local de interação, mas sem a complementaridade estrutural que aumenta os efeitos das forças não estruturais. Exemplos de interações não específicas incluem, mas sem que isso constitua uma limitação, forças eletrostáticas, hidrófobas, e de van der Waals, bem como, pontes de hidrogénio.

Um "sal" é um composto formado a partir da interação de um ácido com uma base. Um sal útil para a invenção inclui, mas sem que isso constitua uma limitação, acetato (p. ex. acetato de sódio), citrato (p. ex. citrato de sódio), cloreto (p. ex. cloreto de sódio), sulfato (p. ex. sulfato de sódio), ou um sal de potássio.

Conforme se utiliza no presente documento, "solvente" refere-se a uma substância líquida capaz de dissolver ou dispersar uma ou mais substâncias, de modo a se obter uma solução. Os solventes incluem solventes orgânicos e aquosos, sendo que os solventes orgânicos úteis incluem um solvente não polar, etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, hexileno glicol, propileno glicol, e 2,2-tiodiglicol.

O termo "detergente" refere-se a agentes tensioativos iônicos e não iônicos como polisorbatos (p. ex. polisorbatos 20 ou 80); poloxameros (p. ex. poloxamero 188); Triton; dodecilsulfato de sódio (SDS); laurilsulfato de sódio; octil-glicosido de sódio; lauril-, miristil-, linoleil-, ou estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, ou cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isoestearamidopropil-betaína (p. ex. lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isostearamidopropil-dimetil-amina; sódio metil cocoil-, ou disódio metil oleil-aurato; e a série MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, Nova Jérсия). Detergentes úteis são um polisorbato, como um polisorbato 20 (TWEEN 20®) ou polisorbato 80 (TWEEN 80®).

Um "polímero" no presente documento é uma molécula formada por ligação covalente de dois ou mais monómeros, em que os monómeros não são resíduos de aminoácidos. Exemplos de polímeros incluem polietil glicol, polipropil glicol, e copolímeros (p. ex. os Pluronic, PF68, etc.). Um polímero útil é o polietileno glicol (PEG), p. ex. PEG 400 e PEG 8000.

Os termos "troca iónica" e "cromatografia de troca iónica" referem-se a processos cromatográficos em que um soluto de interesse (como uma proteína) numa mistura interage com um composto com carga ligado (por exemplo, por ligação covalente) a um material de troca iónica em fase sólida de modo a que o soluto de interesse interaja não especificamente com o composto com carga mais ou menos do que outros solutos que constituem impurezas ou contaminantes presentes na mistura. Os solutos contaminantes presentes na mistura são eluídos de uma coluna preenchida com o material de troca iónica de forma mais rápida ou mais lenta do que o soluto de interesse ou ligam-se à resina ou são excluídos da resina, em comparação com o soluto de interesse. A "cromatografia de troca iónica" inclui especificamente troca catiónica, troca aniónica, e cromatografia multimodal.

A frase "material de troca iónica" refere-se a uma fase sólida com carga negativa (i.e. uma resina de troca catiónica) ou carga positiva (i.e. uma resina de troca aniónica). A carga pode ser providenciada por meio da ligação à fase sólida de um ou mais ligandos com carga, p. ex. por ligação covalente. Em alternativa, ou adicionalmente, a carga pode ser uma propriedade inerente da fase sólida (p. ex. esse é o caso da sílica, que tem uma carga global negativa).

Por "fase sólida" entende-se uma matriz não aquosa à qual podem aderir um ou mais ligandos com carga. A fase sólida pode ser uma coluna de purificação, uma fase descontínua de partículas discretas, uma membrana, ou um filtro, etc. Exemplos de materiais para formar a fase sólida incluem polissacáridos (como agarose e celulose); e outras matrizes mecanicamente estáveis como sílica (p. ex. vidro de poro controlado), poli(estireno-divinil)benzeno, poliacrilamida, partículas de cerâmica e derivados de qualquer um dos acima referidos.

Uma "resina de troca catiónica" refere-se a uma fase sólida que tem uma carga negativa e que, portanto, tem catiões livres para troca com catiões numa solução aquosa que passe

sobre ou através da fase sólida. Um ligando com carga negativa ligado à fase sólida para formar uma resina de troca catiónica pode ser, p. ex., um carboxilato ou um sulfonato. Resinas de troca catiónica disponíveis comercialmente incluem carboxi-metil-celulose, sulfopropilo (SP) imobilizado em agarose (p. ex. SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ ou SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, da Pharmacia) e sulfonilo imobilizado em agarose (p. ex. S-SEPHAROSE FAST FLOW™ da Pharmacia).

Uma "resina de troca iónica multimodal" refere-se a uma fase sólida covalentemente modificada com grupos catiónicos, aniónicos, e hidrófobos. Uma resina de troca iónica multimodal disponível comercialmente é a BAKERBOND ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) que contém grupos fracos de troca catiónica, uma concentração baixa de grupos de troca aniónica, e ligandos hidrófobos ligados a uma matriz em fase sólida de gel de sílica.

O termo "resina de troca aniónica" é utilizado no presente documento para se referir a uma fase sólida que tem uma carga positiva, p. ex. que possui um ou mais ligados de carga positiva, como grupos amino quaternários, ligados à referida resina. Resinas de troca aniónica comercialmente disponíveis incluem celulose DEAE, QAE SEPHADEX™ e FAST Q SEPHAROSE™ (Pharmacia).

Um "tampão" é uma solução que resiste a mudanças no pH pela ação dos seus componentes ácido-base conjugados. Vários tampões que podem ser utilizados, dependendo, por exemplo no pH desejado do tampão são descritos em Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Numa forma de realização, o tampão tem um pH compreendido entre cerca de 2 e cerca de 9, alternativamente entre cerca de 3 e cerca de 8, alternativamente entre cerca de 4 e cerca de 7 alternativamente entre cerca de 5 e cerca de 7. Exemplos não limitativos de tampões que podem controlar o pH neste intervalo incluem os tampões MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato, e amónio, bem como suas combinações.

O "tampão de carregamento" é aquele que é usado para carregar a composição que compreende a molécula polipeptídica de interesse e uma ou mais impurezas na resina de troca iónica. O tampão de carregamento tem uma condutividade e/ou pH de modo a que a molécula polipeptídica de interesse (e geralmente uma ou mais impurezas) se liga(m) à resina de troca iónica ou de modo a que a proteína de interesse passe através da coluna enquanto que as impurezas se ligam à resina.

O "tampão intermediário" é utilizado para eluir uma ou mais impurezas da resina de troca iónica, antes da eluição da molécula polipeptídica de interesse. A condutividade e/ou o pH do tampão intermediário é/são de tal modo que uma ou mais impurezas são eluídas da resina de troca iónica, mas sem que haja a eluição de quantidades significativas do polipéptido de interesse.

O tempo "tampão de lavagem" quando utilizado no presente documento refere-se a um tampão usado para lavar ou re-equilibrar a resina de troca iónica, antes da eluição da molécula polipeptídica de interesse. Convenientemente, o tampão de lavagem e o tampão de carregamento podem ser o mesmo, mas isso não é obrigatório.

O "tampão de eluição" é usado para eluir o polipéptido de interesse da fase sólida. A condutividade e/ou pH do tampão de eluição é/são de modo a que o polipéptido de interesse seja eluído da resina de troca iónica.

Um "tampão de regeneração" pode ser usado para regenerar a resina de troca iónica de modo a que possa ser re-utilizada. O tampão de regeneração tem uma condutividade e/ou pH conforme necessário para remover substancialmente todas as impurezas e o polipéptido de interesse da resina de troca iónica.

O termo "condutividade" refere-se à capacidade de uma solução aquosa para conduzir uma corrente elétrica entre dois eletrodos. Na solução, a corrente avança por transporte iónico. Portanto, com um aumento da quantidade de iões presentes na solução aquosa, a solução irá ter uma maior condutividade. A

unidade de medição da condutividade é milliSiemens por centímetro (mS/cm), e pode ser medida usando-se um medidor de condutividade comercializado, p. ex., pela Orion. A condutividade de uma solução pode ser modificada, alterando-se a sua concentração de iões. Por exemplo, a concentração de um agente tampão e/ou a concentração de um sal (p. ex. NaCl ou KCl) na solução pode ser alterada para se obter a condutividade desejada. Preferencialmente, a concentração salina dos vários tampões é modificada para se obter a condutividade desejada como no Exemplo abaixo apresentado.

O "pI" ou "ponto isoelétrico" de um polipéptido refere-se ao pH a que a carga negativa do polipéptido está em equilíbrio com a sua carga positiva. O pI pode ser calculado a partir da carga líquida dos resíduos de aminoácidos ou dos resíduos de ácido siálico dos hidratos de carbonos ligados do polipéptido ou pode ser determinado por focagem isoelétrica.

Por "ligação" de uma molécula a um material de troca iónica entende-se a exposição da molécula ao material de troca iónica sob as condições apropriadas (pH/condutividade) de modo a que a molécula seja imobilizada de modo reversível no ou sobre o material de troca iónica em resultado das interações iónicas entre a molécula e o grupo ou grupos com carga do material de troca iónica.

Por "lavagem" do material de troca iónica entende-se a passagem de um tampão apropriado através ou sobre o material de troca iónica.

Por "eluição" de uma molécula (p. ex. polipéptido ou impureza) de um material de troca iónica entende-se a remoção da molécula do material de troca iónica por meio da modificação da força iónica do tampão que envolve o material de troca iónica de modo a que o tampão compita com a molécula pelos sítios com carga do material de troca iónica.

Conforme se utiliza no presente documento, "filtrado" refere-se à porção da amostra que passa através da membrana de filtração.

Conforme se utiliza no presente documento, "retentado" refere-se à porção da amostra que fica substancialmente retida na membrana de filtração.

"Filtração de fluxo tangencial" ou "TFF" ou "filtração com fluxo cruzado" refere-se a um processo de filtração em que a mistura da amostra circula através do topo de uma membrana enquanto a aplicação de pressão faz com que determinados solutos e moléculas pequenas passem através da membrana. Tipicamente, a solução flui paralelamente à membrana de filtração. O diferencial de pressão através da membrana faz com que o líquido e os solutos filtráveis passem através do filtro. Isto pode ser realizado como um processo de fluxo contínuo, uma vez que se passa repetidamente a solução sobre a membrana enquanto o fluido que passa através do filtro é continuamente recolhido para um circuito separado.

"Filtração por fluxo tangencial de desempenho elevado" ou "HPTFF" refere-se a TFF realizada a um fluxo entre 5% e 100% da pressão transmembranar no fluxo *versus* a curva de pressão transmembranar (veja-se, por exemplo, van Reis, R. Patente US 5 256 694; Patente US 4 490 937; e Patente US 6 054 051).

Conforme se utiliza no presente documento, "impurezas do lisado" refere-se a todos os componentes indesejados de uma mistura que contém o ADN plasmídico, incluindo ADN cromossómico, proteínas do hospedeiro, resíduos celulares, proteínas secretadas pela célula hospedeira, incluindo resíduos da membrana celular, hidratos de carbono, nucleótidos pequenos degradados, ARN do hospedeiro, lipossacáridos, etc.

"Membrana de celulose" refere-se a um polímero de celulose em que a celulose consiste em unidades repetidas de D-glicose. O grupo de álcool primário de um monómero de glicose proporciona a espécie reativa na membrana ao qual o composto com carga está covalentemente ligado.

"Membrana de CRC" refere-se a uma membrana compósita de celulose regenerada preparada efetuando-se um molde de celulose num substrato microporoso para controlar o tamanho

médio dos poros e limitar o número de defeitos numa película de celulose.

"Composto com carga" refere-se ao composto ligado à membrana de filtração, em que o composto compreende um grupo com uma carga positiva ou negativa sob as condições usadas para separar a proteína de uma mistura de proteínas. De acordo com a invenção, o composto com carga pode ainda conter um braço *linker* entre a membrana e o grupo com carga, de modo a que o composto com carga se projete a partir da superfície da membrana. Quando o composto com carga se projeta da superfície de um poro para o lúmen do poro, o composto com carga modifica o tamanho efetivo do poro e modifica a distribuição do tamanho dos poros na membrana.

"Composto com carga reativo" refere-se ao composto com carga antes de se ligar à membrana, de tal modo que o composto com carga reativo ainda retém o grupo reativo que promove a reação membrana-composto com carga reativo. Por exemplo, quando um composto com carga é o ião propil trimetil amónio covalentemente ligado a uma membrana de celulose, o composto com carga reativo pode ser brometo de bromopropil trimetil amónio. A ligação covalente envolve um deslocamento nucleofílico do bromo alquilo por um álcool primário da matriz de celulose.

"Braço *linker*" refere-se à porção da molécula do composto com carga entre a porção que reage ou reagiu com um grupo reativo na superfície da membrana de filtração e o grupo com carga. Preferencialmente, o braço *linker* é uma cadeia de átomos ou subunidades moleculares, sendo que essa cadeia é inerte nas condições da reação usadas para ligar covalentemente o composto com carga à membrana e é ainda inerte nas condições aquosas usadas durante a separação da proteína. Um braço *linker* pode compreender, mas sem que isso constitua uma limitação, uma cadeia de alquilo de um a vinte átomos de carbono, uma cadeia de hidrato de carbono de um a quinze resíduos (incluindo, por exemplo, ribose e desoxirribose), uma cadeia de dextrano de um

a 15 resíduos de sacáridos, uma cadeia de aminoácidos de um a vinte cinco aminoácidos, e outros polímeros (tais como os utilizados para produzir a própria membrana) de uma a vinte cinco unidades repetidas. Quando um composto com carga compreende uma cadeia de aminoácidos como um braço *linker* e o resíduo com carga é o aminoácido terminal da cadeia, a cadeia lateral do aminoácido terminal é preferencialmente uma cadeia lateral com carga.

"Crivagem" (*sieving*, em inglês) refere-se à razão entre a concentração de um determinado soluto no filtrado (a jusante da membrana) e a concentração do mesmo soluto na solução de alimentação (a montante da membrana) (veja-se Zeman e Zydney, *supra*, p. 308). Geralmente, um valor elevado de crivagem sugere que o soluto passa facilmente através da membrana, enquanto que um valor baixo de crivagem sugere que o soluto é predominantemente retido na membrana. Quando se deseja reter o soluto a montante da membrana, é preferível um coeficiente de crivagem reduzido.

"Permeabilidade" refere-se à razão entre a taxa de filtração e a diferença da pressão líquida através da membrana. A permeabilidade é, por conseguinte, o inverso da resistência da membrana. A permeabilidade da membrana é determinada principalmente pela distribuição do tamanho dos poros, porosidade (densidade dos poros), espessura da membrana e viscosidade do solvente. De um modo geral, à medida que a permeabilidade aumenta, a crivagem aumenta. Quando a crivagem é melhorada adicionando-se um composto carregado à membrana, a melhoria da crivagem é uma melhoria relativa a uma membrana que possua substancialmente a mesma permeabilidade do que a membrana com carga, mas sem o composto com carga. Assim, quando a melhoria é uma redução da crivagem porque um soluto com carga, como uma proteína, é retido por uma membrana com carga semelhante, a crivagem é uma redução a uma permeabilidade comparável ou substancialmente igual. Por conseguinte, a taxa de filtração é mantida, aumentando-se a seletividade da

membrana.

A "distribuição do tamanho dos poros" refere-se, basicamente, ao número de poros que possuem um raio efetivo, R , próximo de um raio teórico, r , expresso como uma função de densidade de probabilidade (veja-se, Zeman, L.J. e Zydney, A.L., *supra*, p. 299-301). À medida que aumenta o desvio padrão dos raios efetivos dos poros, a distribuição do tamanho dos poros aumenta. Uma distribuição do tamanho dos poros mais reduzida resulta numa redução do desvio padrão dos poros em relação a um valor teórico. Isto é alcançando, por exemplo, quando os tamanhos de alguns dos poros maiores são reduzidos, adicionando-se composto com carga ao poros mais largos de uma membrana com carga. O princípio de intrusão de poros por líquido-líquido é útil para medir a distribuição do tamanho dos poros (veja-se R. van Reis e A.L. Zydney, *supra*, p. 2201). De acordo com este princípio, dois líquidos extremamente imiscíveis, como soluções de um sal sulfato e um poli(etileno glicol) são colocadas em contacto, misturando-se para atingir o equilíbrio de partição. A membrana a ser testada é impregnada com um dos líquidos de modo a que todos os poros estejam preenchidos. Após drenagem dos tubos de alimentação, o segundo líquido é introduzido no sistema. O primeiro líquido é então deslocado para fora dos poros pelo segundo líquido, e a taxa de fluxo é medida como uma função da pressão transmembranar. Os dados resultantes fornecem informação sobre a distribuição do tamanho dos poros e podem ser correlacionados com o limite de exclusão molecular (MWC0) nominal (veja-se R. van Reis and A.L. Zydney, *supra*, p. 2201).

"Carga líquida", quando se refere a uma carga de uma membrana ou de uma proteína, significa uma carga que é predominantemente positiva ou negativa, mas não se refere a um valor específico do número de cargas positivas em relação ao número de cargas negativas na membrana ou proteína, exceto quando indicado em contrário. Do mesmo modo, "carga semelhante" e "mesma carga" referem-se à situação em que uma proteína com

uma determinada carga, positiva ou negativa, é comparada com uma membrana ou outra proteína que tem uma determinada carga, positiva ou negativa.

"Tratamento" refere-se a tratamento terapêutico e profilático ou medidas de prevenção. Indivíduos em necessidade de tratamento incluem indivíduos já com o distúrbio bem como aqueles em que se quer prevenir contra o distúrbio.

Um "distúrbio" consiste em qualquer condição patológica que beneficiaria de um tratamento com o polipéptido purificado conforme descrito no presente documento. Isto inclui distúrbios ou doenças agudas e crônicas incluindo as condições patológicas que predisõem o mamífero para o distúrbio em questão.

A palavra "marcador" quando utilizada no presente documento refere-se a um composto ou composição detetável que é conjugada diretamente ou indiretamente com o polipéptido. O marcador pode ser ele próprio detetável (p. ex. marcadores de isótopos radioativos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição substrato que é detetável.

B. Formas de Realizar a Invenção

1. Purificação de proteínas

Os fabricantes de produtos farmacêuticos à base de proteínas devem cumprir normas reguladoras estritas, incluindo requisitos extremamente rigorosos de pureza. Para garantir a segurança, as agências reguladoras, como a agência federal norte-americana reguladora dos medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) exigem que os compostos farmacêuticos à base de proteínas, incluindo aqueles produzidos por tecnologia de ADN recombinante, sejam substancialmente livres de impurezas como proteínas da célula hospedeira, vírus, ADN, endotoxinas, agregados, fragmentos, e variantes da proteína recombinante, e afins. Embora existam vários protocolos de purificação de proteínas disponíveis e usados amplamente na indústria farmacêutica, esses protocolos incluem tipicamente

purificação por afinidade, como purificação com Proteína A no caso de anticorpos, para obter o grau exigido de pureza. Conforme se referiu anteriormente no presente documento, embora a afinidade com Proteína A remova mais do que 99,5% das impurezas, este benefício tem o seu preço. A Proteína A é significativamente mais cara do que os meios de não afinidade, e os métodos de purificação à base de Proteína A geralmente levantam problemas relacionados com a estabilidade da resina, possibilidade de ser lavada e tempo de vida, contaminação (*leakage*) com ligando, e a potencial imunogenicidade dos resíduos de Proteína A que contaminam o produto purificado.

A presente invenção envolve a purificação de proteínas, em particular proteínas recombinantes, por meio de um protocolo que não inclui uma etapa de cromatografia de afinidade. Mais especificamente, a invenção proporciona métodos para a purificação de proteínas (recombinantes), incluindo, mas sem que isso constitua uma limitação, etapas que não incluem a cromatografia de afinidade, a um grau que permite o uso direto das proteínas purificadas em terapêuticas para seres humanos, eliminando dessa forma as etapas onerosas da cromatografia de afinidade, bem como uma etapa final de ultrafiltração associada a diafiltração frequentemente necessária para a concentração e formulação da proteína terapêutica.

A presente invenção baseia-se nas descobertas experimentais que demonstram que as proteínas recombinantes podem ser purificadas a partir de uma mistura que compreende proteínas da célula hospedeira por esquemas de purificação que não recorrem à cromatografia de afinidade no mesmo grau que processos que incorporam uma etapa de cromatografia de afinidade. Em particular, descobriu-se que um processo de purificação por não afinidade, que inclui duas etapas de cromatografia de não afinidade seguido por filtração de fluxo tangencial de desempenho elevado (HPTFF) como etapa final, pode resultar num produto de pureza elevada que contém impurezas proteicas da célula hospedeira numa quantidade inferior a 100

partes por milhão (ppm).

A proteína a ser purificada usando-se o método descrito no presente documento é geralmente produzida usando-se técnicas recombinantes. Métodos para a produção de proteínas recombinantes são descritos, p. ex., nas Patentes US 5 534 615 e US 4 816 567. Em formas de realização preferidas, a proteína de interesse é produzida numa célula CHO (veja-se, p. ex. WO 94/11026). Exemplos de proteínas que podem ser purificadas usando-se o processo descrito no presente documento foram acima descritas.

Quando se usa técnicas recombinantes, a proteína pode ser produzida intracelularmente, no espaço periplásmico ou secretada diretamente para o meio de cultura. Se a proteína for produzida intracelularmente, como uma primeira etapa, os resíduos em partículas, quer sejam fragmentos de células hospedeiras ou de lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou filtração. Quando a proteína é secretada para o meio de cultura, as células hospedeiras recombinantes podem ser separadas do meio de cultura de células, por exemplo, por filtração de fluxo tangencial.

Quando se obtém uma mistura contendo a proteína de interesse, a separação desta das outras proteínas produzidas pela célula é geralmente efetuada recorrendo-se a uma combinação de diferentes técnicas de cromatografia. Estas técnicas separam misturas de proteínas com base na sua carga, grau de hidrofobicidade ou tamanho. Existem várias resinas de cromatografia disponíveis para cada uma dessas técnicas, permitindo uma adaptação precisa do esquema de purificação à proteína específica em questão. A base de cada um destes métodos de separação é que as proteínas se deslocam a diferentes velocidades quando descem por uma longa coluna, obtendo-se uma separação física que aumenta à medida que avançam na coluna ou que têm uma adesão seletiva ao meio de separação, sendo depois eluídas de forma diferenciada por diferentes tampões. Nalguns casos, a proteína desejada é separada das impurezas por estas

aderirem especificamente à coluna, enquanto que a proteína de interesse não adere, ou seja, a proteína de interesse está presente na fração não ligada ("*flow through*").

Conforme se referiu anteriormente, de acordo com a presente invenção, as proteínas podem ser purificadas a um grau caracterizado pela presença de menos do que 100 ppm de impurezas proteicas da célula hospedeira por uma ou duas etapas de purificação por não afinidade, seguido de HPTFF. As etapas de purificação por não afinidade podem ser à base de cromatografia de não afinidade ou podem incluir técnicas de purificação não cromatográficas.

Etapas de purificação cromatográfica de não afinidade exemplificativas incluem cromatografia em hidroxapatite; cromatografia de interação hidrófoba (HIC); HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica; cromatografia com separação pelo ponto isolétrico; e filtração em gel; cromatografia de troca catiónica (p. ex., SP-Sepharose); cromatografia de troca aniónica (p. ex., Q-Sepharose), cromatografia multimodal (p. ex., ABx), e cromatografia de interação hidrofóbica induzida por carga.

Etapas exemplificativas de purificação não cromatográficas de não afinidade incluem diálise, precipitação com sulfato de amónio, e precipitação com etanol.

O processo da presente invenção inclui duas etapas cromatográficas de separação por não afinidade, seguido de HPTFF, HPTFF com membrana opcionalmente com carga. O protocolo de purificação inclui as etapas de (1) cromatografia de troca catiónica, (s) cromatografia de troca aniónica, e (3) HPTFF, nesta ordem, na ausência de etapas de purificação por afinidade, e preferencialmente sem etapas adicionais de purificação de nenhum tipo.

A cromatografia de troca iónica é uma técnica cromatográfica que é frequentemente usada na purificação de proteínas. Na cromatografia de troca iónica, zonas com carga na superfície do soluto são atraídas por cargas opostas ligadas

a uma matriz cromatográfica, desde que a força iónica do tampão envolvente seja baixa. A eluição é geralmente efetuada por meio do aumento da força iónica (i.e. a condutividade) do tampão para competir com o soluto pelos locais com carga da matriz de troca iónica. Mudar o pH e, assim, alterar a carga do soluto é outra forma de se efetuar a eluição do soluto. A mudança em condutividade ou pH pode ser gradual (eluição por gradiente) ou por passos (eluição por passos). No passado, estas mudanças eram progressivas; i.e., o pH ou a condutividade são aumentados ou reduzidos numa única direção.

A preparação impura derivada das células hospedeiras recombinantes é carregada na matriz cromatográfica em fase sólida equilibrada usando o tampão de carregamento que pode ser o mesmo do que o tampão de equilíbrio. À medida que a preparação impura avança através da fase sólida, a proteína e outras impurezas (como proteínas do ovário do hamster chinês, CHOP, quando a proteína é produzida numa célula CHO) ligam-se de forma diferente à fase sólida, produzindo-se dessa forma a separação à medida que as proteínas passam através da coluna cromatográfica.

A quantidade e tipo de tampão, sal, e/ou outro composto da composição tampão são de modo a que a quantidade combinada resulte na eluição da(s) impureza(s) proteica(s) de forma diferenciada da proteína de interesse, em que a proteína de interesse pode ser retida em relação às impurezas ou as impurezas são retidas em relação à proteína de interesse. Os sais tampão e outros aditivos úteis na realização da invenção incluem, sem que isso constitua uma limitação, sais tampão como acetato, citrato, histidina, fosfato, acetato de amónio, MES, CHAPS, MOPSO, Tris, e afins; sais para ajustar a força iónica do tampão como cloreto de sódio e cloreto de potássio; e outros aditivos como aminoácidos (como glicina e histidina), agentes caotrópicos (como ureia), álcoois (como etanol, manitol, glicerol, e álcool benzílico), detergentes (como Tween™ e C12E8), açúcares (como sacarose, manitol, maltose, trealose,

glicose, e frutose). Qualquer destes tampões e aditivos e as concentrações usadas podem variar de acordo com o tipo de cromatografia praticado, sendo que as composições tampão e de aditivo e concentrações são facilmente determinadas por métodos correntes.

O pH do tampão de eluição pode estar compreendido entre cerca de 2 e cerca de 9, em alternativa entre cerca de 3 e cerca de 8, entre cerca de 4 e cerca de 8, ou entre cerca de 5 e cerca de 8, embora o pH ou intervalo de pH para a eluição seja determinado de acordo com a proteína de interesse e o tipo de cromatografia e HPTFF efetuados. Intervalos de pH apropriados para o tampão de carregamento, lavagem, ou eluição são facilmente determinados por métodos correntes de modo a que a proteína de interesse seja recuperada numa forma ativa. Exemplos de tampões de eluição para este fim incluem tampões citrato ou acetado.

A força iónica de um tampão (medida como condutividade, por exemplo) pode estar compreendida entre cerca de 0,2-20 mS/cm, em alternativa entre cerca de 0,2-8 mS/cm, entre cerca de 0,2-6 mS/cm, entre cerca de 0,2-4 mS/cm, entre cerca de 0,2-2 mS/cm, ou entre cerca de 1-2 mS/cm, embora a força iónica ou intervalo de força iónica para um tampão de carregamento, de lavagem, ou de eluição seja determinada de acordo com a proteína de interesse e o tipo de cromatografia efetuada e os tampões de diafiltração do método de HPTFF efetuado. Intervalos de força iónica apropriados para um tampão são facilmente determinados por métodos correntes de modo a que a proteína de interesse seja recuperada numa forma ativa.

A etapa de cromatografia de troca catiónica remove tipicamente pelo menos parte das proteínas da célula hospedeira, p. ex. CHOP, se a proteína tiver sido produzida em células CHO, e variantes, produtos de degradação, e agregados da proteína a ser purificada. A etapa de cromatografia de troca aniónica purifica adicionalmente a proteína das restantes proteínas da célula hospedeira, p. ex., CHOP, variantes,

produtos de degradação, e agregados da proteína, e também de endotoxinas e impurezas de ADN.

Após a cromatografia de não afinidade, a proteína de interesse eluída é submetida a HPTFF. A HPTFF é uma operação unitária bidimensional que seletivamente separa solutos com base no tamanho e na carga. Ao recorrer a vários avanços recentes, a HPTFF consegue proporcionar a seletividade elevada necessária para uma purificação de proteínas efetiva. Em primeiro lugar, ao contrário dos processos tradicionais com membranas, a HPTFF é efetuada num regime dependente da pressão sob condições para minimizar o *fouling* (sujamento), explorar a polarização por concentração, otimizar a separação por meio da manutenção de um fluxo e uma pressão transmembrana praticamente uniforme ao longo do módulo de separação (van Reis, R., Patentes US 5 256 694; US 5 490 937; e US 6 054 051, *supra*). A seletividade da separação pode ser melhorada controlando-se o pH e a força iónica do tampão do filtrado para maximizar diferenças no volume efetivo de diferentes espécies numa mistura (van Reis *et al.* (2001), *supra*; van Reis *et al.* (1997), *supra*; e Saksena, S. e Zydney, A.L., *Biotechnol. Bioeng.* 43:960-968 (1994)). Além disso, a carga elétrica da membrana pode ser modificada para aumentar a exclusão eletrostática de todas as espécies com carga semelhante. Assim, uma membrana com carga positiva vai apresentar uma maior rejeição de proteínas com carga positiva do que uma membrana com carga negativa com uma dimensão de poro semelhante (van Reis *et al.* (2001), *supra*; Nakao, S. *et al.*, *Desalination* 70 :191-205 (1988); e van Reis *et al.*, *J. Membr. Sci.* 159:133-142 (1999)). Além disso, as separações de proteínas por HPTFF são efetuadas usando-se o modo de diafiltração em que a impureza (ou produto) é arrastado por lavagem para fora do retentado por meio da adição simultânea de tampão fresco ao reservatório de alimentação à medida que o filtrado é removido através da membrana. Esta adição de tampão mantém uma concentração apropriada de proteína no retentado ao longo da separação. A

diafiltração também possibilita a obtenção de fatores de purificação para produtos recolhidos no retentado que são superiores à seletividade da membrana devido à remoção contínua de impurezas no filtrado (van Reis *et al.* (2001), *supra*; e van Reis, R. e Saksena, S., J. Membr. Sci. 129:19-29 (1997)).

Uma membrana de filtração de HPTFF útil para separações de proteínas é uma barreira seletiva sintética (frequentemente polimérica) ou ultrafiltração (UF) à escala laboratorial (veja-se Leos J. Zeman e Andrew L. Zydney, "Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications," 1996, Marcel Dekker, Inc., p. 3). Nestes processos, alguns componentes do fluxo de alimentação, como proteínas, passam através dos poros da membrana para o filtrado, enquanto outras proteínas ou componentes, geralmente maiores, são retidos pela membrana no retentado (veja-se Zeman e Zydney, *supra*, p. 3).

A ultrafiltração de proteínas consiste num processo de separação por membranas induzido pela pressão usado para a concentração ou purificação de soluções com proteínas (Robert van Reis e Andrew L. Zydney, "Protein Ultrafiltration" in Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, M.C. Flickinger e S.W. Drew, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1999), p. 2197). As membranas de UF têm tipicamente um tamanho médio de poro entre 10 e 500 Angströms, que se situa entre o tamanho médio de poro das membranas usadas na osmose reversa e na microfiltração. A ultrafiltração separa solutos com base em diferenças na taxa de filtração de diferentes componentes através da membrana em resposta a uma determinada força motriz que consiste na pressão (R. van Reis e A.L. Zydney, *supra*, p. 2197). As taxas de filtração dos solutos e, por conseguinte, a seletividade da membrana são determinadas por interações termodinâmicas e hidrodinâmicas (R. van Reis e A.L. Zydney, *supra*, p. 2197). A ultrafiltração é frequentemente usada em processamento a jusante para a concentração de proteínas, troca de tampão e dessalinização, purificação de proteínas, eliminação de vírus,

e clarificação (R. van Reis e A.L. Zydney, *supra*, p. 2197).

Quando se usa HPTFF, a proteína desejada é recolhida no retentado ou no filtrado dependendo das taxas relativas de filtração (R. van Reis e A.L. Zydney, *supra*, p. 2197). A HPTFF é útil para separar proteínas de tamanho semelhante usando as membranas semipermeáveis acima descritas (veja-se, por exemplo, R. van Reis, et al., *Biotech. Bioeng.* 56:71-82 (1997) e R. van Reis et al., *J. Memb. Sci.* 159:133-142 (1999)). Com a HPTFF obtém-se uma seletividade elevada por meio do controlo do fluxo do filtrado e da mecânica do fluido do dispositivo para minimizar *fouling* (sujamento) e explorar os efeitos da polarização por concentração (R. van Reis et al., *J. Memb. Sci.* 159:133-142 (1999)).

O desempenho da HPTFF pode ser avaliado por dois parâmetros, seletividade e produtividade (*throughput*), que são usados para otimizar o rendimento e o fator de purificação do processo (van Reis e Saksena, *supra*, 1997; van Reis et al., *supra*, 1999). A seletividade é definida como a razão entre os coeficientes de crivagem observados dos solutos permeáveis e retidos. Uma vez que a aplicação da HPTFF se baseia na retenção de uma proteína alvo e na crivagem da HCP, ou impurezas, a seletividade é descrita como:

$$\Psi = \frac{S_{HCP}}{S_{\text{proteína alvo}}} \quad \text{Equação 1}$$

em que a razão do coeficiente de crivagem é definida como a seguinte razão sem unidades:

$$S = \frac{C_{\text{filtrado}}}{C_{\text{alimentação}}} \quad \text{Equação 2}$$

em que C_{filtrado} e $C_{\text{alimentação}}$ são as concentrações dos solutos no filtrado e nos tubos de alimentação.

A produtividade (*throughput*) é definida como o produto do fluxo do filtrado e a diferença na crivagem entre solutos permeáveis e retidos:

$$J \cdot \Delta S = J \cdot (S_{HCP} - S_{\text{proteína alvo}}) \quad \text{Equação 3}$$

Outro parâmetro do processo calculado é o rendimento do retentado durante diafiltração a volume constante. Este rendimento é expresso como:

$$Y = e^{-NS_{\text{proteína alvo}}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que N representa o número de diavolumes e S representa a crivagem do soluto considerado.

Mais detalhes sobre as etapas da purificação por HPTFF serão fornecidos nos Exemplos abaixo apresentados.

A medida preferida de purificação de proteínas pelo processo da presente invenção é a medida de impureza proteica das células hospedeiras, p. ex. impureza de CHOP, quando a proteína recombinante a ser purificada é produzida em células CHO. A proteína purificada deve conter preferencialmente menos de 100, mais preferencialmente menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, menos de 5 ppm, ou menos de 3 ppm de proteínas da célula hospedeira, p. ex. CHOP, em que os valores em ppm são calculados como acima definido.

A proteína assim recuperada pode ser formulada num veículo farmacologicamente aceitável e é usada para vários diagnósticos, terapêuticos ou outras utilizações conhecidas para essas moléculas.

2. Anticorpos

A proteína preferida a ser purificada de acordo com a presente invenção é um anticorpo. Em particular, de acordo com o descrito nos Exemplos abaixo apresentados, para a purificação de anticorpo monoclonal humanizado recombinante (RhuMab), líquido colhido da cultura de células (HVVF) condicionado a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam RhuMab foi carregado numa coluna de troca catiônica inicial (Resina SP-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences;

(S)). O material recolhido na coluna S, o *pool* S, foi recolhido da coluna de SP-Sepharose, submetido a condicionamento e, a seguir, carregado numa coluna de troca aniónica (resina Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences; (Q)). O material recolhido da coluna de troca aniónica (como a coluna Q, como a *pool* Q) foi purificado por HPTFF.

Anticorpos no âmbito da presente invenção incluem, mas não se limitam a: anticorpos anti-HER2 incluindo Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992), Patente US 5 725 856); anticorpos anti-CD20 como anti-CD20 "C2B8" quiméricos como descrito na Patente US 5 736 137 (RITUXAN®), uma variante quimérica ou humanizada do anticorpo 2H7 como descrito na Patente US 5 721 108, B1, ou Tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993), e Patente WO 95/23865); anticorpos anti-VEGF incluindo anticorpos anti-VEGF humanizados e/ou por maturação por afinidade como o anticorpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN® (Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), Patentes WO 96/30046, e WO 98/45331, publicada a 15 de outubro, 1998); anticorpos anti-PSCA (WO01/40309); anticorpos anti-CD40, incluindo S2C6 e suas variantes humanizadas (WO00/75348); anti-CD11a (Patentes US 5 622 700, WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991), e Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)); anti-IgE (Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993), e Patente WO 95/19181); anti-CD18 (Patente US 5 622 700, emitida a 22 de abril, 1997, ou como descrito na Patente WO 97/26912, publicada a 31 de julho, 1997); anti-IgE (incluindo E25, E26 e E27; Patente US 5 714 338, emitida a 3 de fevereiro, 1998 ou Patente US 5 091 313, emitida a 25 de fevereiro, 1992, Patente WO 93/04173 publicada a 4 de Março, 1993, ou Pedido de Patente Internacional PCT/US98/13410 submetido a 30 de junho, 1998, Patente US 5 714 338); anticorpo anti-recetor de Apo-2 (WO 98/51793 publicada a 19 de novembro, 1998); anticorpos anti-TNF- α incluindo cA2 (REMI- CADE®), CDP571 e MAK-195 (Veja-se, Patente US 5 672 347

emitida a 30 setembro, 1997, Lorenz et al. J. Immunol. 156 (4): 1646-1653 (1996), e Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9): 1461-1469 (1995)); anti-fator tecidual (TF) (Patente Europeia 0 420 937 B1 concedida a 9 de novembro, 1994); anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ humana (WO 98/06248 publicada a 19 de fevereiro, 1998); anti-EGFR (anticorpo 225 quimérico ou humanizado como descrito em WO 96/40210 publicada a 19 de dezembro, 1996); anticorpos anti-CD3 como OKT3 (Patente US 4 515 893 emitida a 7 de maio, 1985); anticorpos anti-CD25 ou anti-tac como CHI-621 (SIMULECT®) e (ZENAPAX®) (veja-se a Patente US 5 693 762 emitida a 2 de dezembro, 1997); anticorpos anti-CD4 como o anticorpo cM-7412 (Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)); anticorpos anti-CD52 como CAMPATH-1H (Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)); anticorpos anti-recetor de Fc como o anticorpo M22 dirigido contra Fc γ RI como descrito em Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995); anticorpos anti-antígeno carcinoembrionário (CEA) como hMN-14 (Sharkey et al. Cancer Res. 55 (23 Sup.) 5935s-5945s (1995); anticorpos dirigidos contra células epiteliais mamárias incluindo huBrE-3, hu-Mc 3 e CHL6 (Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); e Richman et al. Cancer Res. 55(23 Sup.): 5916s-5920s (1995)); anticorpos que se ligam a células do carcinoma do cólon como C242 (Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996)); anticorpos anti-CD38, p. ex. AT 13/5 (Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)); anticorpos anti-CD33 como Hu M195 (Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995) e CMA- 676 ou CDP771; anticorpos anti-CD22 como LL2 ou LymphoCide (Juweid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)); anticorpos anti-EpCAM como 17-1A (PANOREX®); anticorpos anti-GpIIb/IIIa como abciximab ou c7E3 Fab (REOPRO®); anticorpos anti-RSV como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticorpos anti-CMV como PROTOVIR®; anticorpos anti-VIH como PRO542; anticorpos anti-hepatite como o anticorpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticorpo anti-CA 125 OvaRex; anticorpo BEC2 anti-idiotípico contra o epítipo GD3; anticorpos anti- $\alpha v\beta 3$

VITAXIN®; anticorpo anti-carcinoma de células renais humanas como ch-G250; ING-1; anticorpo anti-17-1A humano (3622W94); anticorpo anti-tumor coloretal humano (A33); anticorpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra o gangliosídeo GD3; anti-carcinoma epidermóide humano (SF-25); e anticorpos anti-antigénio leucocitário humano (HLA) como Smart ID10 e o anticorpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1). Os antigénios alvo preferidos para o anticorpo do presente documento são: recetor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a, e CD40.

Para além dos anticorpos especificamente acima identificados, um especialista na área pode produzir anticorpos dirigidos contra um antigénio de interesse, p. ex., usando as técnicas abaixo descritas.

(a) Seleção e preparação do antigénio

O anticorpo da presente invenção é dirigido contra um "antigénio" de interesse. De preferência, o antigénio é um polipéptido biologicamente importante e a administração do anticorpo a um mamífero que sofra de uma doença ou distúrbio pode resultar num benefício terapêutico para esse mamífero. Porém, também se abrange anticorpos dirigidos contra antigénios não polipeptídicos (como antigénios glicolipídicos associados a tumores; veja-se a Patente US 5 091 178). Quando o antigénio é um polipéptido, pode ser uma molécula transmembranar (p. ex., um recetor) ou um ligando como um fator de crescimento. Antigénios exemplificativos incluem as proteínas abaixo descritas na secção (3). Alvos moleculares exemplificativos para anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40; membros da família de recetores ErbB como o recetor EGF, recetor HER2, HER3 ou HER4; molécula de adesão celular como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina α/β 3 incluindo as suas subunidades α ou β (p. ex. anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento como VEGF; IgE; antigénios eritrocitários; recetor flk2/flt3; recetor de obesidade (OB); recetor *mpl*; CTLA-4;

proteína C, ou quaisquer dos outros antigénios mencionados no presente documento. Os antigénios a que os anticorpos acima listados se ligam são especificamente incluídos no âmbito do presente documento.

Antigénios solúveis ou seus fragmentos, opcionalmente conjugados com outras moléculas, podem ser usados como imunogénios para produzir anticorpos. No caso de moléculas transmembranares, como os recetores, pode usar-se fragmentos destas (p. ex. o domínio extracelular de um recetor) como imunogénios. Em alternativa, pode usar-se como imunogénio as células que expressam a molécula transmembranar. Essas células podem ser derivadas de uma fonte natural (p. ex. linhas de células cancerosas) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula transmembranar.

Outros antigénios e suas formas úteis para preparar anticorpos serão evidentes para os especialistas na área.

(b) Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são preferencialmente produzidos em animais por injeções múltiplas por via subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio com uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, p. ex. hemocianina de *Megathura crenulata*, albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor da tripsina de soja usando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster maleimidobenzoil succinimida (conjugação através dos resíduos de cisteína), N-hidroxi-succinimida (através dos resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 representam grupos alquilo diferentes.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos, ou derivado combinando-se, p. ex., 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando-se a solução por via intradérmica em múltiplos

locais. Um mês depois os animais recebem uma dose de reforço de 1/5 a 1/10 da quantidade inicial do antigénio ou conjugado no adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos locais. Sete a 14 dias depois, sangram-se os animais e o soro é testado para determinação do título de anticorpos. Os animais recebem doses de reforço até o título estabilizar num patamar (*plateau*). Preferencialmente, o animal recebe uma dose de reforço contendo o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado com uma proteína diferente ou através de uma reagente de reticulação diferente. Os conjugados também pode ser produzidos em cultura de células recombinantes como proteínas de fusão. Os agentes agregantes como alúmen também são usados adequadamente para aumentar a resposta imune.

(c) *Anticorpos Monoclonais*

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos pelo método do hibridoma inicialmente descrito por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), ou por métodos de ADN recombinante (Patente US 4 816 567).

No método do hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, como um hamster ou um macaco do género *Macaca*, é imunizado como anteriormente descrito no presente documento para estimular o aparecimento de linfócitos que produzem ou conseguem produzir anticorpos que se irão ligar especificamente à proteína usada na imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. A seguir, os linfócitos são fundidos com células do mieloma usando um agente de fusão adequado, como polietilenoglicol, para formar um célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e desenvolvidas num meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais

não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas vai incluir tipicamente hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), substâncias essas que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são as que se fundem de modo eficiente, mantêm uma produção de anticorpos estável e a nível elevado pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio de crescimento como o meio HAT. Entre essas, as linhas de células de mieloma preferidas são as linhas de mieloma murino, como as derivadas dos tumores de ratinhos MOPC-21 e MPC-11 disponível no Salk Institute Cell Distribution Center, São Diego, Califórnia EUA, e as células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Também foram descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma humano-ratinho para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

O meio de cultura em que as células de hibridoma crescem é testado para a produção de anticorpos monoclonais contra o antigénio. Preferencialmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, como um radioensaio (RIA) ou um ensaio imunoenzimático (ELISA).

Após se terem identificado as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limite e desenvolvidos por métodos correntes (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem crescer

in vivo sob a forma de tumores ascíticos num animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelo subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluído ascítico, ou soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas como, por exemplo, Proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxapatite, electroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade. Preferencialmente, utiliza-se o procedimento de cromatografia com Proteína A descrito no presente documento.

O ADN que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado usando-se procedimentos convencionais (p. ex., usando-se sondas oligonucleotídicas capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias leves e pesadas dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem com uma fonte preferida desse ADN. Depois de isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que são a seguir transfetados em células hospedeiras como células de *E. coli*, células COS de símios, células do ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra forma não produzem a proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes.

O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo-se a sequência que codifica os domínios constantes das cadeia pesada e leve humana no lugar das sequências homólogas murinas (Patente US 4 816 567; Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), ou por ligação covalente à sequência que codifica a imunoglobulina de parte ou da totalidade da sequência que codifica uma polipéptido que não seja uma imunoglobulina.

Tipicamente esses polipéptidos diferentes da imunoglobulina vão substituir os domínios constantes de um anticorpo ou os domínios variáveis de um local de ligação ao antigénio de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de ligação ao antigénio com especificidade para uma antigénio e um outro lugar de ligação

ao antigénio com especificidade para uma antigénio diferente.

Os anticorpos monoclonais podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos apresentados em fagos criadas usando-se as técnicas descritas em McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respetivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de afinidade elevada (na gama do nM) por mistura (*shuffling*) de cadeias (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como por infeção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para a construção de bibliotecas de fagos muito vastas (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis às técnicas de hibridoma tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

(d) *Anticorpos humanos e humanizados*

Um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos que foram introduzidos a partir de uma fonte não humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente designados por resíduos "importados" (*import*), que são geralmente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser efetuada essencialmente seguindo o método de Winter e colegas (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), substituindo-se com sequências da CDR ou das CDR de roedores as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Por conseguinte, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US 4 816 567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da CDR e possivelmente alguns resíduos

da região FR foram substituídos por resíduos de locais análogos de anticorpos de roedores.

A escolha dos domínios variáveis humanos, tanto leve e pesado, a ser usados na produção de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método designado por "melhor ajustamento", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é rastreada contra toda a biblioteca das sequências conhecidas de domínios variáveis humanos. A sequência humana mais próxima à do roedor é então aceita como a região FR humana para o anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)). Outro método usa uma região *framework* específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um determinado subgrupo de cadeias leves ou pesadas. A mesma região *framework* pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados mantendo a afinidade elevada para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados concetuais usando modelos tri-dimensionais das sequências parentais e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tri-dimensionais estão normalmente disponíveis e são conhecidos dos especialistas na área. Existem programas informáticos que exemplificam e permitem a visualização de estruturas conformacionais tri-dimensionais de sequências candidatas de imunoglobulinas selecionadas. A observação dessas representações visuais permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência candidata de imunoglobulina, *i.e.*, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de ligar-se ao seu

antigénio. Desta forma, os resíduos da região FR das sequências recipientes e de importação podem ser selecionados e combinados de modo a se obter as características desejadas para o anticorpo, como uma maior afinidade para o(s) antigénio(s) alvo. Em geral, os resíduos da CDR estão envolvidos e influenciam de forma mais direta e substancial a ligação ao antigénio.

Alternativamente, é atualmente possível produzir animais transgênicos (p. ex. ratinhos) capazes de produzir, após imunização, um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção (do inglês, *joining*) da cadeia pesada do anticorpo (J_H) em ratinhos mutantes na linha germinal e quiméricos resulta na inibição completa da produção endógena de anticorpos. A transferência do conjunto (*array*) de genes da imunoglobulina da linha germinal humana para esses ratinhos mutantes na linha germinal vai resultar na produção de anticorpos humanos após inoculação com antigénios. Veja-se, p. ex., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); e Duchosal et al. Nature 355:258 (1992). Os anticorpos humanos também podem ser derivados a partir de bibliotecas de apresentação em fagos (*phage display*) (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996)).

(e) *Fragmentos de Anticorpos*

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos eram derivados por digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, e.g., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) e Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Porém, estes fragmentos podem atualmente ser produzidos por células

hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas de anticorpos apresentados em fagos referidas anteriormente. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de *E. coli* e ligados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ pode ser isolados diretamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para um especialista na área. Noutras formas de realização, o anticorpo de eleição é um fragmento de cadeia única Fv(scFv). Veja-se WO 93/16185.

(e) Anticorpos multi-específicos

Os anticorpos multi-específicos têm especificidades de ligação pelo menos para dois antigénios diferentes. Embora essas moléculas se liguem normalmente apenas a dois antigénios (i.e. anticorpos bi-específicos, BsAbs), a utilização desta expressão no presente documento abrange anticorpos com mais especificidades como anticorpos tri-específicos.

Os métodos para produzir anticorpos bi-específicos são bem conhecidos na área. A produção tradicional de anticorpos bi-específicos completos baseia-se na co-expressão de dois pares cadeia pesada-cadeia leve da imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem diferentes especificidades (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Devido à segregação aleatória das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma potencial mistura de 10 moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura bi-específica correta. A purificação da molécula correta, que é geralmente efetuada por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante complicada e os rendimentos dos produtos são baixos. Procedimentos semelhantes são revelados em WO 93/08829, e em Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acordo com outra abordagem descrita em W096/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser modificada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais pequenas de aminoácidos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (p. ex. tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de dimensão idêntica ou semelhante à cadeia lateral ou cadeias laterais grandes são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo por meio da substituição de cadeias laterais grandes de aminoácidos por cadeias mais pequenas (p. ex. alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero relativamente a outros produtos indesejados como homodímeros.

Os anticorpos bi-específicos incluem anticorpos hetero-conjugados ou ligados por ligação cruzada. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode estar acoplado à avidina e outro à biotina. Esses anticorpos foram, por exemplo, propostos para direcionar células do sistema imune contra células indesejadas (Patente US 4 676 980), e para o tratamento de infeção por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos por qualquer método conveniente de reticulação. Agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na área e são revelados na Patente US 4 676 980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

Também se encontram descritas na literatura técnicas para produzir anticorpos bi-específicos a partir de fragmentos de anticorpos. Por exemplo, é possível preparar-se anticorpos bi-específicos por ligação química. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos sofrem clivagem proteolítica para gerar fragmentos F(ab')₂. Esses fragmentos são reduzidos na presença de arsenito de sódio, agente de complexação do ditiol, para estabilizar

ditióis próximos e impedir a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' produzidos são, a seguir, convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo bi-específico. Os anticorpos bi-específicos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progressos recentes vieram facilitar a recuperação direta dos fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos bi-específicos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo completamente humanizado bi-específico F(ab')₂. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente por *E. coli* e submetido a acoplamento químico *in vitro* para formar o anticorpo bi-específico. O anticorpo bi-específico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobre-expressam o recetor ErbB2 e células T humanas normais, bem como de desencadear a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor da mama humano.

Foram descritas várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpos bi-específicos diretamente a partir de cultura de células recombinantes. Por exemplo, foram produzidos anticorpos bi-específicos usando-se *zipper*s de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos de *zipper*s de leucina das proteínas Fos e Jus foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão génica. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos à região charneira para formar monómeros e a seguir re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia dos "*diabodies*" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) proporciona um mecanismo alternativo para a produção de fragmentos de

anticorpos bi-específicos. Os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável da cadeia leve (V_L) por um *linker* que é demasiado pequeno para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Por conseguinte, os domínios V_H e V_L de um fragmento são obrigado a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares do outro fragmento, formando-se assim dois locais de ligação ao antigénio. Também foi descrita outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpos bi-específicos usando-se dímero de Fv de cadeia única (sFv). Veja-se Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994). Alternativamente, os anticorpos podem ser "anticorpos lineares" conforme descrito em Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Fd em tandem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que foram um par de regiões de ligação ao antigénio. Os anticorpos lineares podem ser bi-específicos ou mono-específicos.

São contemplados anticorpos com mais do que duas valências. Por exemplo, pode preparar-se anticorpos tri-específicos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

3. Imunoadesinas

A produção mais simples e direta de imunoadesinas combina o(s) domínio(s) de ligação da adesina (p. ex. o domínio extracelular (ECD) de um recetor) com as regiões charneira e Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Normalmente, na preparação das imunoadesinas da presente invenção, o ácido nucleico que codifica o domínio de ligação da adesina é fundido na região C-terminal ao ácido nucleico que codifica a região N-terminal de uma sequência do domínio constante da imunoglobulina, sendo também possíveis, porém, fusões na região N-terminal.

Tipicamente, nessas fusões o polipéptido quimérico codificado retém pelo menos funcionalmente ativos os domínios charneira, C_{H2} e C_{H3} da região constante de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Também são efetuadas fusões na região

C-terminal da porção Fc de um domínio constante ou na região imediatamente N-terminal com a região C_n1 da cadeia pesada ou da região correspondente da cadeia leve. O local preciso em que a fusão ocorre não é essencial; locais específicos são bem conhecidos e podem ser selecionados para otimizar a atividade biológica, secreção ou as características de ligação da imunoadesina.

Numa forma de realização preferida, a sequência de adesina é fundida ao N-terminal do domínio Fc da imunoglobulina G₁ (IgG₁). Pode fundir-se toda a região constante da cadeia pesada à sequência da adesina. Porém, mais preferencialmente, usa-se na fusão uma sequência que começa na região charneira precisamente a montante do local de clivagem da papaína que define quimicamente a região Fc da IgG (i.e. resíduo 216, considerando o resíduo 114 como o primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada), ou locais análogos de outras imunoglobulinas. Numa forma de realização preferida, a sequência de aminoácidos da adesina está fundida à região charneira e C_H2 e C_H3 ou (b) aos domínios C_H1, região charneira, C_H2 e C_H3, de uma cadeia pesada de IgG.

Para imunoadesinas bi-específicas, as imunoadesinas são montadas como multímeros e, particularmente, como heterodímeros ou heterotetrâmeros. Geralmente, estas imunoglobulinas montadas terão estruturas unitárias conhecidas. Uma unidade estrutural básica de quatro cadeias é a forma em que ocorrem IgG, IgD e IgE. Uma unidade de quatro cadeias é repetida nas imunoglobulinas de maior peso molecular; a IgM geralmente ocorre como um pentâmero de quatro unidades básicas que se mantêm unidas por ligações dissulfureto. A globulina IgA e, ocasionalmente, a globulina IgG podem também existir sob a forma multimérica no soro. No caso de um multímero, as quatro unidades podem ser iguais ou diferentes entre si.

Vários exemplos de imunoadesinas montadas no âmbito do presente documento são apresentados a seguir de forma

esquemática:

- (a) AC_L-AC_1 ;
- (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;
- (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, V_LC_L-AC_H, \text{ ou } V_LC_L-V_HCH)$
- (d) $AC_L-V_HCH-(AC_H, \text{ or } AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;
- (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$; e
- (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HCH)_2$,

em que A representa sequências de aminoácidos da adesina idênticas ou diferentes;

V_L é um domínio variável da cadeia leve da imunoglobulina;

V_H é um domínio variável da cadeia pesada da imunoglobulina;

C_L é um domínio constante da cadeia leve da imunoglobulina;

C_H é um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina;

n é um número inteiro superior a 1;

Y designa o resíduo de uma agente de reticulação covalente.

Por questões de concisão, as estruturas acima apresentadas contêm apenas as características essenciais; não indicam os domínios de junção (J) ou outros domínios das imunoglobulinas, nem são indicadas as ligações de dissulfureto. Porém, nos casos em que esses domínios sejam necessários para a atividade de ligação, serão construídos de modo a estar presentes nos locais que normalmente ocupam nas moléculas de imunoglobulina.

Alternativamente, as sequências de adesina podem ser inseridas entre as sequências da cadeia pesada e da cadeia leve da imunoglobulina, de forma a que se obtenha uma imunoglobulina que contém uma cadeia pesada quimérica. Nesta forma de realização, as sequências de adesina são fundidas à extremidade 3' de uma cadeia pesada de imunoglobulina em cada braço de uma imunoglobulina, quer entre o domínio charneira e o domínio C_{H2} ou entre os domínios C_{H2} e C_{H3} . Construções semelhantes foram

descritas por Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991).

Embora a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina não seja necessária nas imunoadesinas da presente invenção, uma cadeia leve de imunoglobulina pode estar presente quer por ligação covalente com um polipéptido de fusão de cadeia pesada da imunoglobulina-adesina ou fundida diretamente à adesina. No caso anterior, um ADN que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina é tipicamente co-expresso com o ADN que codifica a proteína de fusão cadeia pesada da imunoglobulina-adesina. Após a secreção, a cadeia pesada híbrida e a cadeia leve serão ligadas covalentemente para proporcionar uma estrutura semelhante à imunoglobulina contendo pares cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina ligados por ligação dissulfureto. Os métodos adequados para a preparação dessas estruturas são, por exemplo, revelados na Patente US 4 816 567, emitida a 28 de março, 1989.

As imunoadesinas são construídas mais convenientemente fundindo-se a sequência de cADN que codifica a porção de adesina *in frame* com uma sequência de cADN da imunoglobulina. Porém, também se pode recorrer à fusão de fragmentos genômicos de imunoglobulina (veja-se, e.g. Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990); e Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusão requer a presença de sequências reguladoras de Ig para a expressão. Os cADN que codificam as regiões constantes da cadeia pesada da IgG podem ser isolados com base nas sequências publicadas a partir de bibliotecas de cADN derivadas de linfócitos do sangue periférico ou do baço, por técnicas de hibridação ou por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os cADN que codificam a "adesina" e as partes de imunoglobulina da imunoadesina são inseridos em tandem num vetor plasmídico que dirige a expressão eficiente nas células hospedeiras escolhidas.

4. Outras proteínas que contém a região C_H2/C_H3

Noutras formas de realização, a proteína a ser purificada

é uma proteína que é fundida ou conjugada com uma região C_{H2}/C_{H3}. Essas proteínas de fusão podem ser produzidas para aumentar a semi-vida sérica da proteína. Exemplos de proteínas biologicamente importantes que podem ser conjugadas desta forma incluem renina; uma hormona de crescimento humana; hormona de crescimento bovina; fator de libertação da hormona de crescimento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora da tiróide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A da insulina; cadeia B da insulina; proinsulina; hormona estimuladora do folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagon; fatores de coagulação como fator VIIIC, fator IX, fator tecidual; fator de von Willebrands; fatores anti-coagulação como Proteína C; fator natriurético atrial; surfatante pulmonar: um ativador do plasminogénio do tipo urocinase ou urina humana ou ativador do plasminogénio do tipo tecidual (t-PA); bombesina; trombina, fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase, RANTES (regulada sob ativação, normalmente expresso e secretado por células T); proteína inflamatória dos macrófagos humana (MIP-1-alfa); uma albumina sérica como albumina sérica humana; substância inibidora Muelleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorelaxina; péptido associado à gonadotropina de ratinho; uma proteína microbiana, como uma beta-lactamase; ADNase; IgE; antigénio associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA), como CTLA-4; inibina; ativina; factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); recetores de hormonas ou fatores de crescimento; Proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator neurotrófico como fator neurotrófico derivado do osso (BDNF); neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento nervoso como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF) como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3,

TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I no cérebro), proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina; proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, e CD40; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogenética do osso (BMP); um interferão como interferão-alfa, -beta, e -gama; fatores estimuladores de colónias (CSF), e.g., M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (IL), p. ex., de IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; recetores de células T; proteínas de superfície da membrana; fator de aceleração de decaimento; antigénio viral como, por exemplo, uma porção do invólucro do vírus da SIDA; proteínas de transporte; recetores de endereçamento (*homing*); adressinas; proteínas reguladoras; integrinas como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, uma ICAM, VLA-4 e VCAM; um antigénio associado a tumor como o recetor HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos de qualquer um dos polipéptidos acima mencionados.

Os seguintes exemplos são apresentados a título exemplificativo e não constituem de nenhuma forma uma limitação à presente invenção.

Exemplos

Os exemplos são apresentados para proporcionar aos especialistas na área uma revelação e descrição completa de como produzir e usar os compostos, composições e métodos da invenção e não se destinam a limitar o âmbito do que os inventores consideram como a sua invenção. Embora se tenha tentado garantir a precisão em relação aos valores usados (p. ex., quantidades, temperatura, etc.), dever-se-á ter em consideração que poderá existir algum erro e desvio experimental.

Para facilidade de leitura, apresenta-se a seguir uma lista das abreviatura frequentemente usadas nos exemplos:

C_f Concentração no filtrado (g/l)

C_b Concentração da alimentação (*bulk*) (g/l)

CHO Ovário de hamster chinês

CHOP Proteína(s) de células de ovário de hamster chinês
CV Volumes da coluna
DF Diafiltração
HCCF Líquido colhido da cultura de células
HCI Cromatografia de interação hidrofóbica induzida por carga
HCP Proteína(s) da célula hospedeira
HIC Cromatografia de interação hidrofóbica
HPLC Cromatografia líquida de desempenho elevado
HPTFF Filtração de fluxo tangencial de desempenho elevado
J Fluxo do filtrado ($l m^{-2} h^{-1}$)
Lp Permeabilidade da membrana
N Número de diavolumes
 P_{HCP} Fator de purificação com base na remoção de HCP
 P_{CHOP} Fator de purificação com base na remoção de CHOP
pI Ponto isoelétrico
rhuMAb Anticorpo monoclonal humanizado recombinante
 S_i Crivagem (*sieving*) do soluto "i"
Y Rendimento
 Ψ Seletividade

EXEMPLO 1

Duas etapas de purificação por não afinidade

No presente exemplo, a purificação de HCCF contendo rhuMAb anti-CD11a foi efetuada por processos que consistem em duas etapas de purificado de não afinidade ou três etapas de purificação por não afinidade usando diferentes combinações de matrizes de purificação por não afinidade.

O desempenho da purificação por resinas de troca catiónica (por exemplo, usando-se uma coluna S), de troca aniónica (por exemplo, usando-se uma coluna Q), de troca iónica multimodal (por exemplo, usando-se ABx), de hidroxiapatite (HA), interação hidrofóbica (HIC) e interação hidrofóbica induzida por carga (HCI) foi examinado em cada etapa do processo de purificação cromatográfica para a proteína rhuMAb anti-CD11a. A remoção total da impureza proteica da célula hospedeira

(CHOP) e o rendimento da proteína são descritos em detalhe no Exemplo 2 e comparados com os processos tradicionais que consistem em duas ou três etapas e que incorporam cromatografia com Proteína A (i.e. para processos de duas etapas, ProA seguida de troca aniônica (por exemplo, ProA-Q), e para processos de três etapas, ProA seguida de troca catiônica e, depois, troca aniônica, por exemplo, ProA-S-Q).

Resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ (S, resina de troca catiônica, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), resina Q-Sepharose Fast Flow™ (Q, resina de troca aniônica, Amersham Biosciences, *supra*), resina Bakerbond ABx™ (ABx, resina de troca iônica multimodal, J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ), resina FENIL-SEPHAROSE FAST FLOW™ (HIC, resina de interação hidrofóbica, Amersham Biosciences, *supra*), resina de Hidroxiapatite Cerâmica Macroprep (HA, resina de hidroxiapatite, BioRad Laboratories, Hercules, CA), e resina MEP HYPERCEL™ (HCI, resina de interação hidrofóbica induzida por carga, INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES™, LifeTechnologies, Inc., Rockville, MD) foram empacotadas, cada uma, em colunas de vidro Omni de 0,66 cm d.e. x 20 cm. As condições operacionais da cromatografia são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Condições operacionais da cromatografia

Resina	Tipo de Resina	Modo de operação	Tampões	Condicionamento da Carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Troca catiônica (S)	Ligação não específica e eluição	MES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5 10 CV gradiente até NaCl 500 mM	<5 mS/cm pH 5,5

Resina	Tipo de Resina	Modo de operação	Tampões	Condicionamento da Carga
Bakerbond ABx™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)	Troca iônica multimodal (ABx)	Ligação não específica e eluição	O mesmo que S	O mesmo que S
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Troca aniônica (Q)	<i>Flow-through</i> (recolha da fração não ligada)	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8	<7 mS/cm pH 8
Phenyl Sepharose Fast Flow™, low sub (com concentração baixa de ligando) (Amersham Biosciences, NJ)	Interação hidrofóbica (HIC)	Ligação não específica e eluição	MES 50 mM, Na ₂ SO ₄ 0,8 M, pH 6 15 CV gradiente até 50 MES 50 mM, pH 6	Na ₂ SO ₄ 0,8 M pH 6
Hidroxiapatite cerâmica Macro-Prep, Type II (BioRad, Hercules, CA)	Hidroxiapatite (HA)	Ligação não específica e eluição	fosfato de sódio 10 mM, pH 6,8 10 CV gradiente até fosfato 400 mM, pH 6,8	<3 mS/cm pH 6,8

Resina	Tipo de Resina	Modo de operação	Tampões	Condicionamento da Carga
MEP HYPERCEL™ (Life Technologies, Rockville, MD)	Interação hidrofóbica induzida por carga (HCI)	Ligação não específica e eluição	25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.1, Eluição por passos com acetato 50 mM, pH 4	pH > 7

Todas as colunas foram carregadas com 10 mg de anticorpo por ml de resina a um fluxo de 100 cm/g (5 volumes de coluna por hora).

Entre utilizações, as resinas S; HIC e HCI foram desinfetadas com > 3 volumes de coluna de NaOH 0,5N. As colunas contendo resinas ABx, Q e HA foram empacotadas com resina fresca antes de cada utilização.

As células CHO que expressam rhuMAb anti-CD11a foram cultivadas e foi recolhida uma formulação colhida da cultura de células contendo o anticorpo. A mistura bruta da cultura de células continha aproximadamente 222 000 ppm de CHOP (equivalente a 220 000 ng de CHOP/mg de rhuMAb anti-CD11a). Uma alíquota da mistura bruta foi aplicada a cada uma das resinas para efetuar a Etapa 1 do Quadro 2. Um alíquota do eluído da Etapa 1 foi, a seguir, aplicada a cada uma das diferentes resinas na Etapa 2 do Quadro 2, e o anticorpo e as impurezas foram submetidos a uma separação adicional. O Quadro 1 apresenta em síntese as condições em relação ao tampão para cada etapa. A mistura bruta e cada pool do eluído da primeira etapa

foram ajustados para o pH e a força iónica das condições de tampão da resina a que se aplicou a mistura bruta ou o *pool* do eluído para realização do passo subsequente de purificação. O Quadro 2 apresenta um resumo dos resultados de purificação em termos das concentrações de CHOP medidas após cada uma das duas etapas de purificação por não afinidade.

Quadro 2. Remoção de CHOP após duas etapas de purificação por não afinidade

Resina usada na Etapa 1	CHOP (ppm; ng/mg anticorpo)	Diferentes resinas usadas na Etapa 2:	CHOP (ppm; ng/mg anticorpo)
Processos de teste:			
Q	23,000	Q	14,000
		HIC	3,000
		ABx	1,000
		S	900
		HCI	11,000
HIC	26,000	Q	9,90
		HIC	2,400
		ABx	400
		S	900
Abx	6,600	Q	3,10
		HIC	2,400
		ABx	1,700
		S	1,00
		HCI	2,800
S	14,000	Q	80
		HIC	600
		ABx	140
		S	2,10
Processos de controlo:			
ProA	300	S	30

Das etapas de não afinidade examinadas, a coluna ABx removeu a maioria das impurezas CHOP do HCCP, resultando numa concentração de CHOP de 6600 ppm. A pureza dos *pools* resultantes das duas etapas de purificação por não afinidade estava compreendida entre 80 ppm e 14 000 ppm de CHOP. A purificação em que a primeira etapa foi a purificação S e a segunda etapa, a purificação Q, resultou numa concentração baixa de CHOP, 80

ppm. Porém, quando se inverteram as etapas, com a purificação Q como a primeira etapa e a purificação S como a segunda etapa, o rendimento da purificação foi uma concentração de CHOP de 900 ppm. A ordem das etapas dos processos de não afinidade afetou os resultados ao nível da pureza.

Avaliou-se a purificação adicional usando três etapas de purificação por não afinidade e comparou-se com um processo de purificação de três etapas envolvendo uma etapa de afinidade com cromatografia de Proteína A, i.e. ProA-S-Q, conforme se apresenta nos Quadros 3 e 4. Em relação aos estudos acima descritos referentes a uma processo de purificação em 2 etapas, as alíquotas de uma mistura bruta de cultura de células contendo 220 000 ppm de CHOP foram ajustadas para o pH e força iônica de acordo com o Quadro 1 em função da resina em que foram aplicadas na Etapa 1 do Quadro 3, e procedeu-se do mesmo modo para as Etapas 2 e 3 do Quadro 3. Os resultados da remoção de CHOP usando processos que envolvem três etapas de purificação por não afinidade são apresentados no Quadro 3. Os rendimentos de rhuMAb anti-CD11a de alguns dos processos de purificação por não afinidade em três etapas são apresentados no Quadro 4.

Quadro 3. Remoção de CHOP após três etapas de purificação por não afinidade

Resina usada na Etapa 1	[CHOP], ppm, após Etapa 1	Resina usada na Etapa 2	[CHOP], ppm, após Etapa 2	Diferentes Resinas usadas na Etapa 3	[CHOP], ppm, após Etapa 3
Processos de Teste:					
HIC	26,000	ABx	400	ABx	13
				S	14
				HIC	20
				Q	22
S	14,000	Q	80	ABx	<2
				S	10
				HIC	<2
				Q	30

S	14,000	ABx	140	ABx	28
				S	50
				HIC	6
				Q	<2
Processo de Controle:					
ProA	730	S	160	Q	<2

Quadro 4. Rendimentos de rhuMAb anti-CD11a após três etapas de purificação por não afinidade

Etapa 1:	Etapas dos Processos Etapa 2	Etapa 3	Rendimento global
Processos de teste:			
S 96%	Q 100%	ABx 79%	76%
S 96%	Q 100%	HIC 89%	85%
S 96%	ABx 92%	Q 100%	88%
Processos de controle:			
ProA 97%	S 89%	Q 98%	85%

A combinação de duas ou mais etapas de purificação por não afinidade resultou num nível de pureza, conforme determinado pela eliminação das impurezas de CHOP, de cerca, por exemplo, 14 000 ppm de CHOP após a primeira etapa de não afinidade, cerca de 80 ppm de CHOP após a segunda etapa de não afinidade e cerca de 2ppm de CHOP após a terceira etapa do processo (S-Q-ABx ou HIC) (veja-se Quadro 2), e purezas do produto do anticorpo anti-CD11a conforme se apresenta no Quadro 4.

Exemplo 2

Combinação de Cromatografia de Não Afinidade e Purificação por HPTFF

O presente exemplo envolve a purificação de anticorpo

monoclonal humano recombinante, rhuMAB anti-HER2, com um peso molecular de 160 kD e um pI de cerca de 9,0, de células de ovário de hamster chinês (CHO). O rhuMAB anti-HER2 foi obtido a partir de um processo de cultura de células CHO à escala industrial na Genentech (South San Francisco, CA, EUA). Após a cultura de células CHO, a molécula de rhuMAB anti-HER2 foi parcialmente clarificada por centrifugação e filtração normal de células para remover as células e resíduos celulares. O *pool* resultante consistia em 0,52 mg/ml de produto de rhuMAB anti-HER2 e 0,78 mg/ml de CHOP.

Para purificação do rhuMAB anti-HER2, líquido colhido da cultura de células (HCCF) condicionado compreendendo um produto que consiste no rhuMAB anti-HER2 e proteínas da célula hospedeira de ovário de hamster chinês (CHOP) de células CHO que expressam o rhuMAB anti-HER2 foi carregado numa coluna inicial de cromatografia de troca catiónica (S) (resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences) para remover as proteínas da célula hospedeira ou proteínas CHO (CHOP), variantes, e agregados. As eluições da coluna S foram combinadas num *pool* (*pool* S) e submetidas a uma segunda cromatografia em coluna de troca aniónica (Q) (resina Q-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para remover as CHOP e agregados da proteína alvo. A fração não ligada (*flow-through*) da coluna Q (*pool* Q) foi subdividida e cada *pool* foi submetida ainda a um terceiro processo que consistiu numa HPTFF para remoção adicional das CHOP, variantes e moléculas pequenas. Dois dos *pools* Q foram submetidos a Experiência 1 de HPTFF e Experiência 2 HPTFF conforme abaixo descrito em pormenor.

A. Cromatografia de não afinidade

As colunas de cromatografia foram carregadas com aproximadamente 10 gramas de rhuMAB/litro de resina para um total de cerca de 40 gramas de rhuMAB a um fluxo de 100 cm/h (5 volumes de coluna (CVs) por hora).

1. Métodos

Para preparação das colunas de cromatografia de não afinidade, SP-Sepharose para ligação e eluição e Q-Sepharose para recolha da fração não ligada (flow-through) foram cada uma empacotada em colunas em escala preparativa. As condições operacionais de cada coluna de cromatografia são apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5. Condições Operacionais da Cromatografia de Não Afinidade

Resina	Tipo de Resina	Modo de operação	Tampões	Condicionamento da Carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Troca catiónica (S)	Ligação não específica e eluição	MES 25 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5 10 CV gradiente até NaCl 500 mM	<6 mS/cm pH 5,5
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Troca aniónica (Q)	<i>Flow-through</i> (recolha da fração não ligada)	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8	<8 mS/cm pH 8

O HCCH foi condicionado por diluição do HCCF com água de modo a se obter uma condutividade inferior a 6 mS/cm e ajuste do pH do HCCF com HCl para se obter um pH de 5,5 e foi filtrado através de um filtro de 0,22 µm. Submeteu-se um volume de 66 litros de HCCF condicionado a cromatografia de não afinidade.

A coluna de SP-Sepharose foi equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) do tampão de coluna (Quadro 5). Os 66 litros do HCCF condicionado (<10 g/l) foram carregados numa coluna equilibrada de SP-Sepharose. Após carregar o HCCF condicionado na coluna de SP-Sepharose, a coluna foi lavada com 5 CV do tampão de coluna. As eluições foram efetuadas com tampão de eluição (MES 25, NaCl 500 mM, pH 5,5) com o eluente recolhido a uma

absorvância de 0,1-0,2 UA a 280 nm. A resina de cromatografia foi regenerada numa solução de NaOH 0,5 M e armazenada a seguir em NaOH 0,1 M.

As recolhas da coluna de SP-Sepharose foram agrupadas (*pool* SP) e condicionadas por diluição com água do *pool* S até se obter uma condutividade de aproximadamente 7,5 a 8 mS/cm e ajuste do pH com NaOH para um valor de 8. O *pool* S condicionado foi então filtrado através de um filtro de 0,22 µm. O *pool* SP filtrado (cerca de 9 litros) foi carregado numa coluna de Q-Sepharose que foi equilibrada com 5 CV do tampão de coluna (ver Quadro 5). A fração não ligada (*flow-through*) foi recolhida a uma absorvância de 0,2-0,2 UA a 280 nm e o *flow-through* foi agrupado (*pool* Q). Recolheu-se um volume total de 20,6 litros do *pool* Q.

A resina Q-Sepharose de cromatografia foi regenerada numa solução de NaOH 0,5 M e armazenada a seguir em NaOH 0,1 M. Os 20,6 litros recuperados da coluna Q foram divididos em 3 *pools* idênticos, cada um com um volume de 6,9 litros e uma concentração de cerca de 1,4 g/L de rhuMAb anti-HER2, antes da purificação por HPTFF.

2. Análise

A quantidade de rhuMAb anti-HER2 em cada *pool* a seguir a uma etapa de purificação do processo, i.e. no HCCF e nos *pools* do processo de purificação, foi determinada por análise por HPLC com base em imunoafinidade com Proteína A. A coluna de HPLC foi Poros Proteína A, 4,6 mm d.i. x 100 mm de altura do leito (PerSeptive Biosystems). As amostras e os padrões foram aplicados à coluna num tampão de carregamento, o analito rhuMAb ligado à coluna e, a seguir, eluído sob condições acídicas. A área do pico do material eluído foi comparada com a área do pico de uma curva padrão para calcular a quantidade de rhuMAb. O intervalo do ensaio foi tipicamente de 0,05 mg/mL a 1,0 mg/mL.

Após se ter completado a cromatografia S e Q, amostras dos *pools* foram submetidas a análise por SDS-PAGE (FIGURA 2, pistas 4 e 5, respetivamente). As amostras foram analisadas por

eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), que separou as proteínas de acordo com o tamanho (raio hidrodinâmico relativo). As amostras e os padrões de peso molecular (entre 10 e 200 kDa) foram preparados sob condições não redutoras e carregados num gel a uma quantidade de aproximadamente 2,5 µg/pista. Usou-se no presente exemplo uma gradiente de gel de acrilamida de 10% a 20%, tamanho 8 cm x 8 cm (Zaxis International, Inc., Hudson, OH) e efetuou-se a eletroforese a uma voltagem constante de 170 mV. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas de modo a serem visualizadas. O gel de eletroforese foi então tratado com um corante de prata de acordo com o método descrito por Morrissey (Morrissey, J., *Analytical Biochemistry*, 1981, 117: 307-310). Os resultados são apresentados na Figura 2.

Para determinar a quantidade de rhuMAB anti-HER2 presente em cada *pool* sob a forma de monómero intacto, as misturas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular (SEC) de acordo com o seguinte procedimento. Resumidamente, uma coluna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) foi equilibrada em tampão fosfato salino. Aplicou-se na coluna proximadamente 100 µg de rhuMAB por amostra. A amostra foi eluída da coluna com base no tamanho molecular das moléculas de proteínas presentes na amostra (intervalo ótimo de separação: 10 a 600 kDa). A absorvância do eluído da coluna foi medida a 280 nm e os picos de eluição da proteína foram integrados para determinar a percentagem da área do rhuMAB monomérico. As percentagens de monómero intacto de rhuMAB anti-HER2 no HCCF, no *pool S*, no *pool Q*, e no *pool* da HPTFF são apresentadas no Quadro 8.

A concentração de CHOP foi determinada por um ensaio imunoenzimático (ELISA) usando anticorpos de cabra anti-(proteína da células hospedeira) para quantificar as CHOP. Anticorpos de cabra completos anti-CHOP purificados por afinidade foram imobilizados em poços numa placa de microtitulação. As diluições das amostras dos *pools*, que

continham CHOP, foram incubadas em poços, seguido de incubação com peroxidase conjugada com anti-CHOP completo. A peroxidase de rábano foi então quantificada com o-fenilenodiamina, lendo-se a absorvância a 492 nm. Com base no princípio do ELISA em sanduíche, a concentração da peroxidase corresponde à concentração das CHOP. O intervalo do ensaio ELISA foi tipicamente de 5 ng/mL a 320 ng/mL. Dependendo da concentração das amostras, testou-se 2 a 4 diluições por amostra e calcularam-se as médias dos resultados corrigidos em função da diluição.

B. HPTFF

A filtração de fluxo tangencial de desempenho elevado (HPTFF) é um processo de filtração bi-dimensional, com base na carga e no tamanho, que envolve a separação de solutos com uma diferença de tamanho inferior a 10 vezes. Como se mencionou anteriormente, o *pool* Q foi dividido em 3 *pools* equivalentes, cada um com um volume de 6,9 litros e uma concentração de cerca de 1,4 g/L de rhuMab anti-HER2, antes da purificação adicional por HPTFF. Dois dos *pools* Q foram submetidos à Experiência 1 de HPTFF, cada um sob condições diferentes. Após a determinação, a partir dos estudos da Experiência 1 de HPTFF, das condições ótimas para a HPTFF, *pools* combinados da Experiência 1 e 2 de HPTFF foram submetidos a HPTFF adicional, conforme descrito abaixo em pormenor.

1. Membrana

As membranas de filtração usadas na HPTFF nestes Exemplos são membranas compósitas de celulose regenerada (CRC)-Millipore ULTRACEL™ (Millipore) com um limite de exclusão molecular nominal de 300 kD (PLCMK). Membranas CRC300 mini-PELLICON2® (Millipore) foram modificadas em termos de carga como descrito no presente documento, resultando na membrana de celulose com carga CRC300+ usada nos estudos de HPTFF deste Exemplo. Resumidamente, uma cassette de 300 kD PELLICON-2® (área da membrana de 0,1 m²) foi usada para a experiência de redução de escala (*scale-down*) (mínimo de 1L de

solução). A membrana foi lavada de acordo com um protocolo de preparação do cartucho antes da primeira utilização para remover qualquer solução residual de armazenamento e transporte e para equilibrar a membrana para a condição de tampão apropriada. A membrana foi quimicamente modificada *in situ* usando brometo de bromo-propil-trimetil-amônio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sob condições alcalinas (PCT/US00/19964, em que a totalidade do seu conteúdo é incorporada por referência no presente documento). Especificamente, a membrana foi carregada sem fluxo de filtrado em modo co-corrente, a um fluxo constante de filtrado de $100 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$, com a pressão do retentado fixada a 10 psig, com reciclo total e o filtrado em modo aberto com 1L do ligando dissolvido em NaOH 0,1N e filtrado a $0,2 \text{ }\mu\text{m}$. A Lp antes do carregamento era cerca de $53 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}/\text{psi}$ em NaOH 0,1N e a Lp após o carregamento era cerca de $37 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}/\text{psi}$ em NaOH 0,1N. Após o carregamento, a membrana de carga positiva resultante foi lavada com hidróxido de sódio 0,1 N, desinfetada com 300 ppm de solução MINNCARE™ e armazenada em hidróxido de sódio 1 N. Antes de cada experiência de HPTFF, a membrana foi lavada com o primeiro tampão de diafiltração da experiência para remover a solução de armazenamento e testou-se a integridade. A permeabilidade da membrana foi medida usando o sistema de HPTFF com fluxo de filtrado em modo de co-corrente a um mínimo de três fluxos de filtrado.

2. Sistema de filtração HPTFF

As experiências de HPTFF foram realizadas usando um sistema de filtração de fluxo tangencial completamente automatizado com a configuração básica apresentada na Figura 1. O sistema de HPTFF incluía um tanque de reciclo de aço inoxidável com um volume de 40 litros, medidores de fluxo da alimentação e do filtrado (Admag Modelo 102 e 105, Johnson Yokogawa Corp., Newman, GA) e transdutores de pressão (Modelo MSP220-A2, 0-100 psig = 0-7 bar, Anderson Instruments, Fultonville, NY). As bombas do fluxo de alimentação e do

filtrado em modo co-corrente eram bombas volumétricas (Universal 6, Waukesha-Cherry Burrell, Delavan, WI) enquanto que as bombas de diafiltração e de filtrado eram bombas peristálticas (Modelo L-7518-62, Cole Parmer, Niles, IL). O tanque de reciclo incluía uma sonda de temperatura (Modelo RIX, -29°C a 82°C, Moore Industries, Sepulveda, CA). Todas as tubagens foram feitas em aço inoxidável 316L. A válvula de controlo da pressão do retentado era acionada por um diafragma de aço (Model ½ Mikroseal válvula de controlo sem empanque, H.D. Baumann, Portsmouth, NH), enquanto que todas as outras válvulas eram acionadas pneumáticamente com diafragmas de monómero de etileno propileno dieno (Biotek Modelo 8836-18-BH, ITT Sherotec, Simi Valley, CA). O nível contínuo de líquido no tanque foi medido com uma sonda magneto-estrutiva (Modelo Tempsonics II, MTS, Research Triangle Park, NC). A aquisição e controlo dos dados foram realizados usando software proprietário (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) com software shell MycroAdvantage (Moore Products, Springhouse, PA).

A HPTFF foi realizada a um fluxo de alimentação fixo de $323 \text{ l.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ (taxa do fluxo volumétrico de alimentação dividido pela área da membrana) e uma pressão do retentado de 10 psi. A taxa de fluxo do filtrado em modo co-corrente foi controlada para se obter uma pressão transmembranar igual na entrada (alimentação) e saída (retentado) da cassette da membrana. O fluxo do filtrado foi configurado a $50 \text{ l.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ por ajuste da taxa da bomba do filtrado. O arranque das experiências de HPTFF incluiu uma fase de aumento (*ramp-up*) de todas as taxas de fluxo para maximizar a diferença entre a pressão transmembranar à entrada e saída da cassette. O retentado foi reciclado para o tanque de alimentação, enquanto que o filtrado foi dirigido para um recipiente de recolha. As amostras de alimentação e filtrado foram recolhidas em ambos os casos para a análise do produto e de HCP.

a. Experiência 1 de HPTFF

Após a divisão do *pool Q*, conforme acima descrito, em *pools Q* equivalentes de 6,9 L, uma das *pools Q* foi submetida à Experiência 1 de HPTFF usando-se uma membrana CRC300+ sob as seguintes condições.

As membranas com carga foram equilibradas no primeiro tampão de diafiltração para esta experiência (veja-se o Quadro 7). O *pool Q* foi diluído para reduzir a força iônica e a condutividade do *pool* de rhuMAb para 2,7 mS/cm, e o pH foi ajustado para 4,5 e, a seguir, adicionou-se ao tanque de alimentação (Figura 1). O material no tanque de alimentação foi submetido a concentração por remoção de uma porção da solução. Quando o volume de alimentação atingiu uma concentração de alimentação (C_b) de 10 g/L, a solução no tanque de alimentação foi submetida a etapas sequenciais de diafiltração. A uma condutividade constante de 1,5mS/cm, a diafiltração foi realizada com 10 diavolumes a um pH de 4,5 e 5 diavolumes cada um a pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, e pH 6,5 (Quadro 7). O rendimento foi calculado com base na crivagem do produto quantificável durante a diafiltração usando a seguinte equação: $Y=e^{-NS_{Proteínaalvo}}$ onde S representa a crivagem da proteína alvo e N representa o número de diavolumes.

Quadro 7: Condições experimentais e resultados da etapa de HPTFF do processo de purificação

	Concentração	Diafiltração	Rendimento	[CHOP] final
	C_b (g/L)	pH-N	(%)	ppm
<i>pool Q</i>				410
		4,5 - 10		
		5,0 - 5		
Experiência 1 de HPTFF	10	5,5 - 5	99%	21
		6,0 - 5		
		6,5 - 5		
Experiência 2 de HPTFF	10	4,5 - 10		
		5,5 - 10	99%	17

	Concentração C _b (g/L)	Diafiltração pH-N	Rendimento [CHOP] (%)	final ppm
<i>pool Q</i>				410
		6,5 - 10		
HPTFF adicional (<i>Pools</i> combinados da HPTFF 1 e 2)	10	6,5 - 40	99%	2,2
		6,0 - 5		

A qualidade do produto do *pool* recuperado da Experiência 1 de HPTFF foi submetida a análise, incluindo eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 2, pistas 10), análise da % de monómero intacto de rhuMAB e análise da concentração de CHOP (Quadro 8), conforme acima descrito.

Observou-se uma crivagem (*sieving*) significativa de CHOP com CRC300+ sem qualquer perda significativas de rhuMAB anti-HER2. A concentração final de CHOP no *pool* recuperado da HPTFF realizada com a CRC300+ foi de 21 ppm.

b. Experiência 2 de HPTFF

Outro dos *pools Q*, conforme acima descrito, com 1,4 mg/ml de rhuMAB, 410 ppm de CHOP, um pH de 5,6 e uma condutividade de cerca de 8 mS/cm, foi submetido a uma Experiência 2 de HPTFF.

Conforme acima descrito, a membrana CRC300+ foi equilibrada no primeiro tampão de diafiltração para esta Experiência 2 de HPTFF (veja-se o Quadro 7). O *pool Q* foi diluído com água para reduzir a condutividade para 2,4 mS/cm. O pH foi ajustado para pH 4,5 com HCL. O *pool* resultante condicionado foi carregado no tanque de alimentação. Numa operação única, o *pool* condicionado foi a seguir concentrado a 10 g/L a pH 4,5, seguido de uma diafiltração com um volume constante de retentado compreendendo uma sequência específica de tampões de diafiltração (Quadro 7). Foram escolhidas as seguintes três sequências de tampões de diafiltração: 10 diavolumes cada um a pH de 4,5, 5,5, e 6,5, a uma condutividade constante de 1,5

mS/cm. Todas as experiências de HPTFF foram realizadas a um fluxo de filtrado de $50 \text{ l.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ usando uma mini cassette Pellicon-2® com carga positiva e uma permeabilidade de $36 \text{ m}^{-2}.\text{h}^{-1}/\text{psi}$.

Após a conclusão do processo de HPTFF realizado com a CRC300+, uma amostra do *pool* recuperado foi submetida a análise por SDS-PAGE (Figura 2, pista 11). A qualidade do produto do *pool* recuperado da Experiência 2 de HPTFF foi submetida a uma análise adicional, incluindo cromatografia de exclusão molecular (SEC) e análise da concentração de CHOP (Quadro 8).

Os fatores de purificação para a etapa de HPTFF foram superiores a 24 (i.e. uma remoção de CHOP 24 vezes superior) e a remoção de CHOP ocorreu durante a concentração e a diafiltração. A concentração de CHOP foi reduzida de 410 ppm (concentração no material recuperado da coluna Q de cromatografia) para 17 ppm (concentração no material recuperado da Experiência 2 de HPTFF) (veja-se o Quadro 8). Não se observaram perdas significativas de filtrado.

Quadro 8: Quantificação da proteína das células hospedeiras CHO e análise da pureza da corrente de alimentação de rhuMab anti-HER2 nos processos de purificação

Etapa de Purificação	[CHOP]final ppm	% de monómero intacto de rhuMab (medida por SEC)
HCCF	1.469.000	--
<i>pool</i> S	144.780	95,9%
<i>pool</i> Q	410	97,4%
Experiências 1,2 de HPTFF	21.17	99,8%
Processos de controlo: (usando as etapas: ProA-S-Q-UFDF)	<1	100%

c. HPTFF adicional

O material recuperado após as Experiência 1 e 2 de HPTFF

foi combinado e submetido ainda a uma HPTFF adicional da seguinte forma.

Conforme acima descrito, a membrana CRC300+ foi equilibrada no primeiro tampão de diafiltração e o material combinado foi carregado no tanque de alimentação. O material no tanque de alimentação foi submetido às etapas sequenciais de diafiltração: 40 diavolumes a pH 6,5 e 1,5 mS/cm, seguido de 5 diavolumes a pH 6,0 e 0,3 mS/cm.

O processo adicional de HPTFF reduziu a concentração de CHOP no retentado final para 2,2 ppm. Uma amostra do material recuperado após a HPTFF adicional foi submetida a análise por SDS-PAGE. A qualidade do produto do material recuperado após a HPTFF adicional (Figura 2, pistas 6 e 12) conforme determinado por análise por SDS-PAGE foi comparada com a qualidade do produto do material obtido por um processo de purificação convencional envolvendo ProA, SP, Q e UFDF (Figura 2, pista 7).

O processo de purificação, envolvendo duas etapas de purificação por não afinidade e uma terceira etapa de HPTFF, resultou num nível de pureza, conforme determinado pela eliminação das impurezas CHOP, de cerca de 144 780 ppm de CHOP após a purificação S, de cerca de 410 ppm de CHOP após a purificação Q, e uma pureza final de cerca de 17-21 ppm de CHOP. Uma maior pureza de cerca de 2,2 ppm de CHOP foi obtida pela HPTFF adicional, sendo essa purificação adicional incorporada alternativamente na terceira etapa, proporcionando, dessa forma, um processo de não afinidade em três etapas comparável aos métodos tradicionais que usam a onerosa cromatografia de afinidade.

Exemplo 3

Combinação de Cromatografia de Não Afinidade e Purificação por HPTFF

O presente exemplo envolve a purificação de anticorpo monoclonal humano recombinante, rhuMAb anti-CD40, com um peso molecular de 160 kD e um pI de cerca de 9,3, de células de ovário de hamster chinês (CHO). O rhuMAb anti-CD40 foi obtido a partir

de um processo de cultura de células CHO à escala industrial na Genentech (South San Francisco, CA, EUA). Após a cultura de células CHO, a molécula de rhuMab anti-CD40 foi parcialmente clarificada por centrifugação e filtração normal de células para remover as células e resíduos celulares. O *pool* resultante consistia em 1,7 mg/ml de produto de rhuMab anti-CD40 e 0,4 mg/ml de CHOP.

Para purificação do rhuMab anti-CD40, líquido colhido da cultura de células (HCCF) condicionado compreendendo um produto que consiste no rhuMab anti-CD40 e proteínas da célula hospedeira de ovário de hamster chinês (CHOP) de células CHO que expressam o rhuMab anti-CD40 foi carregado numa coluna inicial de cromatografia de troca catiónica (S) (resina SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences) para remover as proteínas da células hospedeira ou proteínas CHO (CHOP), variantes, impurezas de ADN e agregados. As eluições da coluna S foram combinadas num *pool* (*pool* S) e submetidas a uma segunda cromatografia em coluna de troca aniónica (Q) (resina Q-SEPHAROSE FAST FLOW™, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para remover as CHOP, impurezas de ADN e agregados da proteína alvo. A fração não ligada (*flow-through*) da coluna Q (*pool* Q) foi submetida ainda a uma terceiro processo que consistiu numa HPTFF para remoção adicional das CHOP, variantes e moléculas pequenas.

A. Cromatografia de não afinidade

1. Métodos

Para preparação das colunas de cromatografia de não afinidade, SP-Sepharose para ligação e eluição e Q-Sepharose para recolha da fração não ligada (*flow-through*) foram cada uma empacotada em colunas em escala preparativa. As condições operacionais de cada coluna de cromatografia são apresentadas no Quadro 9.

Quadro 9. Condições Operacionais da Cromatografia de Não Afinidade

Resina	Tipo de Resina	Modo de operação	Tampões da Coluna	Condicionamento da Carga
SP Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)	Troca catiónica (S)	Ligação não específica e eluição	MES 20 mM, Acetato de Na 50 mM, pH 6,5	<7,0 mS/cm pH 6,5
Q Sepharose Fast Flow™ (Amersham Biosciences, NJ)	Troca aniónica (Q)	<i>Flow-through</i> (recolha da fração não ligada)	Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8	<8 mS/cm pH 8

O HCCH foi condicionado por diluição do HCCF com água de modo a se obter uma condutividade inferior a 7 mS/cm e ajuste do pH do HCCF com ácido acético para se obter um pH de 6,5 e foi filtrado através de um filtro de 0,22 μm . A coluna de Sepharose-SO foi equilibrada com 4 volumes de coluna (CV) do tampão de coluna (Quadro 9) e carregada com aproximadamente 30 gramas de rhuMab/litro de resina para um total de 13 gramas de rhuMab a um fluxo de 150 cm/h. Após o carregamento do HCCF condicionado na coluna de SP-Sepharose, a coluna foi lavada com 5 CV de tampão de lavagem (HEPES 20 mM, Acetado de Na 35 mM, pH 8,0) seguido de 3 CV de tampão da coluna (Quadro 9). As eluições foram efetuadas com um gradiente de eluição de 10 CV do tampão da coluna até ao tampão de eluição (MES 20, Acetato de Na 140 mM, pH 6,5) com o eluente recolhido a uma absorvância de 0,1 a 0,5 UA a 280 nm. A resina de cromatografia foi regenerada numa solução de NaOH 0,5 M e armazenada a seguir em NaOH 0,1 M.

O *pool* de SP-Sepharose (*pool* SP) foi condicionado por diluição do *pool* S com água até se obter uma condutividade de aproximadamente 7,5 mS/cm e ajuste do pH com NaOH para um valor de 8. O *pool* S condicionado, com uma massa total de cerca de

9 gramas, foi então filtrado através de um filtro de 0,22 μm . O *pool* SP filtrado condicionado foi carregado numa coluna de Q-Sepharose que foi equilibrada com 5 CV do tampão de coluna (ver Quadro 9). A fração não ligada (*flow-through*) foi recolhida a uma absorvância de 0,2-0,2 UA a 280 nm e o *flow-through* foi agrupado (*pool* Q). A resina Q-Sepharose de cromatografia foi regenerada numa solução de NaOH 0,5 M e armazenada a seguir em NaOH 0,1 M.

2. Análise

A quantidade de rhuMAb anti-HER2 em cada *pool* a seguir a uma etapa de purificação do processo, i.e. no HCCF e nos *pools* do processo de purificação, foi determinada por análise por HPLC com base em imunoafinidade com Proteína A, conforme descrito anteriormente no Exemplo 2. A concentração de CHOP foi determinada usando-se um ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito anteriormente no Exemplo 2. Após se ter completado a cromatografia S e Q, amostras dos *pools* foram submetidas a análise por SDS-PAGE (Figura 5, pistas 3 e 4, respetivamente). O *pool* Q foi diluído para reduzir a força iónica e a condutividade do *pool* de rhuMAb para 1,8 mS/cm, e o pH foi ajustado para 4,5 e, a seguir, adicionou-se ao tanque de alimentação (Figura 1). A etapa de purificação da experiência de HPTFF onde se usou uma membrana de carga positiva CRC300+ (a experiência de HPTFF) foi iniciada através da concentração do material do *pool* Q até o volume de alimentação atingir uma concentração de alimentação (C_b) de 10 g/L. A solução resultante no tanque de reciclo foi então submetida a etapas sequenciais de diafiltração. A uma condutividade constante de 1,5 mS/cm, a diafiltração foi realizada com 5 diavolumes cada a pH 4,5 e a pH 5,5 seguido de 20 diavolumes a pH 6,5, seguido de 10 diavolumes a pH 7,0 (Quadro 10). O rendimento foi calculado com base na crivagem do produto quantificável durante a diafiltração usando a seguinte equação: $Y = e^{-NS_{\text{Proteínaalvo}}}$ onde S representa a crivagem da proteína alvo e N representa o número de diavolumes.

Quadro 10: Condições experimentais e resultados da etapa de HPTFF do processo de purificação

Concentração C_b (g/L)	Diafiltração pH-N	Rendimento [CHOP] final (%)	[ADN] ppm	[ADN] (ppm)
<i>pool Q</i>		96%	15	15
<i>pool HPTFF 10</i>	4,5-5			
	5,5-5	99%	<0,6	<0,6
	6,5 - 20			
	7,0 - 10			

A qualidade do produto do *pool* recuperado desta Experiência de HPTFF foi submetida a análise, incluindo eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 5, pista 5), análise da % de monómero intacto de rhuMAb e análise da concentração de CHOP (Quadro 11), conforme anteriormente descrito no presente documento, no Exemplo 2. A concentração de ADN foi avaliada de acordo com o ensaio do ADN total THRESHOLD® Total DNA Assay (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA) (Quadro 11). O ensaio de ADN total THRESHOLD® Total DNA Assay é específico para ADN de cadeia simples, que é obtido a partir da amostra por desnaturação por calor. O ADN de cadeia simples está marcado com proteínas de ligação, que estão covalentemente ligadas a urease e estreptavidina, e forma um complexo de ADN. O complexo de ADN é filtrado através de uma membrana de nitrocelulose revestida com biotina designada por "stick". A biotina na membrana reage com a estreptavidina no complexo de ADN, capturando o complexo. O *stick* é colocado no leitor Threshold, que contém o substrato, a ureia. A reação enzimática entre a ureia e a urease (no complexo de ADN) altera o pH local da solução do substrato. Um sensor de silício registra a alteração no potencial de superfície, que é proporcional à mudança de pH. A taxa de mudança no potencial de superfície é proporcional à quantidade de ADN. A quantidade das amostras é determinada por comparação com padrões de ADN. As amostras são diluídas de modo a que o conteúdo em ADN se situe dentro do intervalo de medição

da curva padrão (10-400 pg/mL).

Observou-se uma crivagem significativa de CHOP com a membrana de carga positiva CRC300+ usada na HPTFF sem qualquer perda significativa de rhuMab anti-CD40 com carga positiva. A remoção de CHOP ocorreu durante a concentração e a diafiltração. A concentração de CHOP foi reduzida de 15 ppm (concentração no material recuperado da coluna Q de cromatografia) para menos de 0,6 ppm nos primeiros 20 diavolumes (concentração no *pool* de proteínas no tanque de reciclo). A remoção de impurezas de CHOP foi confirmada pela medição da concentração no material recuperado da experiência de HPTFF (veja-se o Quadro 11). Não se observaram perdas significativas de filtrado.

Quadro 11: Quantificação da proteína das células hospedeiras CHO e análise da pureza da corrente de alimentação de rhuMab anti-CD40 nos processos de purificação

Etapa de Purificação	[CHOP]final ppm	% de monómero intacto de rhuMab (medida por SEC)	[ADN] (ppm)
HCCF	240 000	--	>5441
<i>pool</i> S	530	--	0,1
<i>pool</i> Q	15	--	<0,01
<i>pool</i> HPTFF	<0,6	99,5%	<0,006
Processos de controlo: (usando as etapas: ProA-S-Q-UFDF)	3	99,5%	<0,003

O processo de purificação, envolvendo duas etapas de purificação por não afinidade e uma terceira etapa de HPTFF, resultou num nível de pureza, conforme determinado pela (1) eliminação das impurezas CHOP, de cerca de 530 ppm de CHOP após a purificação S, de cerca de 15 ppm de CHOP após a purificação Q, e uma pureza final inferior a cerca de 0,6 ppm de CHOP em 20 diavolumes e pela (2) eliminação de impurezas de ADN, de

cerca de 0,1 ppm de CHOP após a purificação S, de cerca de menos do que 0,01 ppm de ADN após a purificação Q, e uma pureza final inferior a cerca de 0,006 ppm de ADN. Além disso, a análise por eletroforese mostra a pureza comparável do *pool* final resultante do procedimento de não afinidade (FIGURA 5, pista 5) em relação ao *pool* convencional obtido usando-se uma etapa de afinidade (FIGURA 5, pista 10).

A Figura 5 apresenta um gel de SDS-PAGE corado com prata contendo amostras que foram obtidas a diferentes pontos durante a purificação de anticorpo monoclonal recombinante humano (rhuMAb) anti-CD40 de acordo com o Exemplo 3 (pistas 2-5) e comparadas com um processo convencional de purificação incluindo uma etapa de purificação por afinidade (pistas 8-10). As setas que indicam 160 kD, 50 kD, e 25 kD apontam para o anticorpo completo, a cadeia pesada, e a cadeia leve, respectivamente. As outras bandas correspondem a fragmentos de anti-CD40 rhuMAb. A pista 1 é uma mistura de padrões de proteínas. As pistas 2-6 são amostras obtidas após a realização dos processos de não afinidade revelados no Exemplo 3 do presente documento em que o líquido colhido da cultura de células (HCCF) (pista 2) foi purificado por cromatografia de troca catiónica (*pool* S, pista 3), seguido de cromatografia de troca aniônica (*pool* Q, pista 4), seguido de HPTFF usando uma membrana com carga (*pool* HPTFF, pista 5), seguido de e comparado com o material recuperado após lavagem da membrana de HPTFF e do lado da alimentação do dispositivo de HPTFF (*pool* da lavagem com tampão da HPTFF, pista 6). A pista 7 é o branco. As pistas 8-10 correspondem a anti-CD40 numa mistura de HCCF purificada por processos de recuperação convencionais incluindo uma etapa de cromatografia de afinidade com proteína A (dados não apresentados), seguido de uma etapa de cromatografia de troca catiónica (pista 8), seguido de uma etapa de cromatografia de troca aniônica (pista 9), e seguido de uma etapa de ultrafiltração (pista 10).

Este esquema de purificação proporcionou um processo de

EP1501369B1

três etapas de não afinidade comparável aos métodos tradicionais que recorrem à onerosa cromatografia de afinidade.

A descrição acima escrita é considerada como suficiente para permitir a implementação prática da invenção a um especialista na área.

Lista de Sequências

<110> GENENTECH, INC.

<120> PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM BASE NA NÃO AFINIDADE

<130> SJK/FP6249767

<140> EP 03756162.8

<141> 25-04-2003

<150> PCT/US03/13054

<151> 25-04-2003

<150> US 60/375.953

<151> 26-04-2002

<160> 4

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> fonte

<223> /nota = "Descrição da sequência artificial: a sequência está sintetizada"

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn
				20					25					30
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

EP1501369B1

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> fonte

<223> /nota = "Descrição da sequência artificial: a sequência está sintetizada"

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
				20					25					30

Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
			35						40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr
			50						55					60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser
			65						70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
			80						85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr
			95						100					105
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			110						115					120
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			125						130					135
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
			140						145					150
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
			155						160					165
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
			170						175					180
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			185						190					195
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
			200						205					210
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
			215						220					225
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
			230						235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			245						250					255

Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				275					280					285
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
				290					295					300
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				305					310					315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
				320					325					330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				335					340					345
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
				350					355					360
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
				365					370					375
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				380					385					390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				395					400					405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				410					415					420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				425					430					435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
				440					445					

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

EP1501369B1

<213> Sequência artificial

<220>

<221> fonte

<223> /nota = "Descrição da sequência artificial: a sequência está sintetizada"

<400> 3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser
				20					25					30
Lys	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
His	Asn	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

EP1501369B1

<210> 4

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> fonte

<223> /nota = "Descrição da sequência artificial: a sequência está sintetizada"

<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr
				20					25					30
Gly	His	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Met	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Thr
				95					100					105
Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				110					115					120
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
				125					130					135

Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	140	145	150
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	155	160	165
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	170	175	180
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	185	190	195
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	200	205	210
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	215	220	225
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	230	235	240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	320	325	330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	335	340	345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	350	355	360

Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
				365					370					375
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				380					385					390
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
				395					400					405
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				410					415					420
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
				425					430					435
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				440					445					450
Lys														

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 5256694 A, van Reis, R. [0010] [0068] [0098]
- US 5256294 A [0010]
- US 5490937 A [0010] [0098]
- US 6054051 A [0010] [0068] [0098]
- US 5091178 A [0018] [0111]
- US 4816567 A [0020] [0021] [0085] [0116] [0124] [0127]
[0147]
- US 5677171 A [0029]
- US 5622700 A [0030] [0109]
- WO 9823761 A [0030] [0109]
- US 6037454 A [0030]
- US 4490937 A [0068]
- US 5534615 A [0085]
- WO 9411026 A [0085]
- US 5725856 A [0109]
- US 5736137 A [0109]
- US 5721108 B1 [0109]
- WO 9523865 A [0109]
- WO 9630046 A [0109]
- WO 9845331 A [0109]
- WO 0140309 A [0109]
- WO 0075348 A [0109]
- WO 9519181 A [0109]
- WO 9726912 A [0109]
- US 5714338 A [0109]
- US 5091313 A [0109]

- WO 9304173 A [0109]
- US 9813410 W [0109]
- WO 9851793 A [0109]
- US 5672347 A [0109]
- EP 0420937 B1 [0109]
- WO 9806248 A [0109]
- WO 9640210 A [0109]
- US 4515893 A [0109]
- US 5693762 A [0109]
- WO 9316185 A [0131]
- WO 9308829 A [0133]
- WO 9627011 A [0134]
- US 4676980 A [0135]
- WO 9100360 A [0135]
- WO 92200373 A [0135]
- EP 03089 A [0135]
- US 0019964 W [0175]
- EP 03756162 A [0202]
- US 0313054 W [0202]
- US 60375953 B [0202]

Documentos de não patente citados na descrição

- **BOSCHETTI, E. et al.** *Genetic Engineering News*, 2000, vol. 20 (13 [0008]
- High-Performance Tangential-Flow Filtration. **ZYDNEY, A.L.; VAN REIS, R.** *Membrane Reparatations in Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc, 2001, 277-298 [0010]
- **VAN REIS et al.** *Journal of Membrane Science*, 1999, vol. 159, 133-142 [0010]
- **VAN REIS, R. et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, vol. 56, 71-82 [0010]
- **STRATAN, F. et al.** *Monoclonal Antibodies - Coming of Age*, 2001, 1 [0011]
- **BOOTH, M. et al.** *Monoclonal Antibodies: Targeting the*

- Issues*, 2001, 1 [0011]
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0020] [0116]
 - CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0020] [0126]
 - MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0020] [0126] [0130]
 - MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0021]
 - KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0022]
 - CHOTHIA; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0022]
 - JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0023] [0127]
 - RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0023]
 - PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0023]
 - LINDMARK et al. *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0024]
 - BERG et al. *PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 4723-4727 [0027]
 - CHAMOW et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 4268 [0027]
 - SEMBA et al. *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0028]
 - YAMAMOTO et al. *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0028]
 - STEPPE et al. *Transplant Intl.*, 1991, vol. 4, 3-7 [0030] [0109]
 - HOURMANT et al. *Transplantation*, 1994, vol. 58, 377-380 [0030] [0109]
 - HILDRETH et al. *Eur. J. Immunol*, 1983, vol. 13, 202-208 [0030]
 - OLIVE et al. *Human T cell Clones. A new Approach to Immune Regulation*. Humana, 1986, 173 [0030]
 - NISHIMURA et al. *Cell. Immunol.*, 1987, vol. 107, 32 [0030]
 - NISHIMURA et al. *CELL. IMMUNOL.*, 1985, vol. 94, 122 [0030]
 - SPRINGER et al. *Immunol. Rev.*, 1982, vol. 68, 171 [0030]
 - VERMOT DESROCHES et al. *Scand. J. Immunol.*, 1991, vol. 33, 277-286 [0030]
 - BUFFERS. *A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*. Calbiochem Corporation, 1975 [0054]

- **SAKSENA, S.; ZYDNEY, A.L.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, vol. 43, 960-968 [0098]
- **NAKAO, S. et al.** *Desalination*, 1988, vol. 70, 191-205 [0098]
- **VAN REIS et al.** *J. Membr. Sci.*, 1999, vol. 159, 133-142 [0098]
- **VAN REIS, R.; SAKSENA, S.** *J. Membr. Sci.*, 1997, vol. 129, 19-29 [0098]
- **LEOS J. ZEMAN; ANDREW L. ZYDNEY.** *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications.* Marcel Dekker, Inc, 1996, 3 [0099]
- *Protein Ultrafiltration.* **ROBERT VAN REIS; ANDREW L. ZYDNEY.** *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation.* John Wiley & Sons, Inc, 1999, 2197 [0100]
- **R. VAN REIS et al.** *Biotech. Bioeng.*, 1997, vol. 56, 71-82 [0101]
- **R. VAN REIS et al.** *J. Memb. Sci.*, 1999, vol. 159, 133-142 [0101]
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0109]
- **ST JOHN et al.** *Chest*, 1993, vol. 103, 932 [0109]
- **KIM et al.** *Growth Factors*, 1992, vol. 7, 53-64 [0109]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol*, 1993, vol. 151, 2623-2632 [0109]
- **LORENZ et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156 (4), 1646-1653 [0109]
- **DHAINAUT et al.** *Crit. Care Med.*, 1995, vol. 23 (9), 1461-1469 [0109]
- **CHOY et al.** *Arthritis Rheum*, 1996, vol. 39 (1), 52-56 [0109]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-337 [0109]
- **GRAZIANO et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155 (10), 4996-5002 [0109]
- **SHARKEY et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5935s-5945s [0109]
- **CERIANI et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5852s-5856s [0109]

- **RICHMAN et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (23), 5916s-5920s [0109]
- **LITTON et al.** *Eur J. Immunol.*, 1996, vol. 26 (1), 1-9 [0109]
- **ELLIS et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155 (2), 925-937 [0109]
- **JURCIC et al.** *Cancer Res*, 1995, vol. 55 (23), 5908s-5910s [0109]
- **JUWEID et al.** *Cancer Res*, 1995, vol. 55 (23), 5899s-5907s [0109]
- **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, 1986, 59-103 [0117] [0121]
- **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0119]
- **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.* Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0119]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0124]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0126]
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0126]
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0126]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0127]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0127]
- **SIMS et al.** *J. Immunol*, 1993, vol. 151, 2296 [0128]
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0128]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0128]
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0130]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0130]
- **BRUGGERMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0130]
- **DUCHOSAL et al.** *Nature*, 1992, vol. 355, 258 [0130]
- **HOOGENBOOM et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0130]
- **VAUGHAN et al.** *Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 309 [0130]
- **MORIMOTO et al.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0131]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0131] [0136]

- **CARTER et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0131]
- **MILLSTEIN et al.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0133]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0133]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0137]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0138]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0138]
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0138]
- **ZAPATA et al.** *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0138]
- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0139]
- **HOOGENBOOM et al.** *Mol. Immunol*, 1991, vol. 28, 1027-1037 [0146]
- **ARUFFO et al.** *Cell*, 1990, vol. 61, 1303-1313 [0148]
- **STAMENKOVIC et al.** *Cell*, 1991, vol. 66, 1133-1144 [0148]
- **MORRISEY, J.** *Analytical Biochemistry*, 1981, vol. 117, 307-310 [0171]

Lisboa, 11 de Agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para a purificação de uma proteína alvo de uma mistura que contém uma proteína da célula hospedeira, caracterizado por compreender submeter a dita mistura a:

(a) uma primeira etapa de purificação por não afinidade, e

(b) uma segunda etapa de purificação por não afinidade, seguida de

(c) filtração de fluxo tangencial de desempenho elevado (HPTFF), e

(d) isolamento da dita proteína a uma pureza de menos de 100 partes por milhão (ppm) da dita proteína da célula hospedeira, em que a dita primeira etapa de purificação por não afinidade é uma cromatografia de troca catiónica e a segunda etapa de purificação de não afinidade é uma cromatografia de troca aniónica e em que o método não inclui nenhuma etapa de purificação por afinidade.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a dita etapa de cromatografia de troca catiónica ser efetuada num ligando de troca catiónica selecionado a partir do grupo que consiste em carboximetilo, sulfopropilo (SF) e sulfonilo.

3. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a dita etapa de cromatografia de troca catiónica ser efetuada numa resina de troca catiónica selecionada a partir do grupo que consiste em carboxi-metil-celulose, sulfopropilo imobilizado em agarose e sulfonilo imobilizado em agarose.

4. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a dita etapa de cromatografia de troca aniónica ser efetuada num ligando de troca aniónica selecionado a partir do grupo que consiste em DEAE e iões de amónio quaternário.

5. O método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a dita etapa de cromatografia de troca aniónica ser efetuada numa resina de troca aniónica selecionada a partir do grupo que consiste em DEAE celulose, QAE SEPHADEX™, e Q SEPHAROSE™.

6. O método da reivindicação 1 caracterizado por a HPTFF ser realizada usando uma membrana com carga.

7. O método da reivindicação 1 caracterizado por a dita proteína da célula hospedeira ser uma proteína do ovário do hamster chinês (CHOP).

8. O método da reivindicação 1 caracterizado por a dita proteína alvo ser um anticorpo.

9. O método da reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

10. O método da reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser um anticorpo policlonal.

11. O método da reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser um anticorpo humanizado.

12. O método da reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser um anticorpo humano.

13. O método da reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser um fragmento de anticorpo.

14. O método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o dito fragmento de anticorpo ser selecionado a partir do grupo que consiste em fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv, moléculas de anticorpo de cadeia única, diabodies, anticorpos lineares, anticorpos bi-específicos e anticorpos

multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

15. O método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo se ligar especificamente a um antigénio selecionado a partir do grupo que consiste em CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, CD40, recetor EGF, recetor HER2, HER3, HER4, LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha\beta$ 3, CD11a, CD18, CD11b, VEGF, IgE, recetor flk2/flt3, recetor de obesidade (OB), recetor *mpl*, CTLA-4, e polipéptido C.

16. O método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser selecionado a partir do grupo que consiste em anti-HER2; anti-CD20; anti-IL-8; anti-VEGF; anti-PSCA; anti-CD11a; anti-IgE; anti-recetor de Apo-2; anti-TNF- α ; anti-fator tecidual (TF); anti-CD3; anti-CD25; anti-CD34; anti-CD40; anti-tac; anti-CD4; anti-CD52; anti-recetor de Fc; anticorpos anti-antigénio carcinoembriónico (CEA); anticorpos dirigidos contra células epiteliais mamárias; anticorpos que se ligam a células do carcinoma do cólon; anti-CD33; anti-CD22; anti-EpCAM; anti-Gp11b/IIIa; anti-RSV; anti-CMV; anti-VIH; anti-hepatite; anti- $\alpha\beta$ 3; anti-carcinoma de células renais humanas; anti-17-1A humano; anti-tumor coloretal humano; anti-melanoma humano; anti-carcinoma epidermóide humano; e anticorpos anti-antigénio leucocitário humano (HLA).

17. O método de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por o dito anticorpo ser selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpos anti-recetor HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD20, anti-CD11a, e anti-CD40.

18. O método da reivindicação 1, caracterizado por a proteína alvo ser uma imunoadesina.

19. O método da reivindicação 1, caracterizado por a proteína

alvo ser uma molécula semelhante a um anticorpo.

20. O método da reivindicação 19, caracterizado por a dita molécula semelhante a um anticorpo ser uma proteína fundida ou conjugada com uma região CH2/CH3.

21. O método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a dita proteína ser selecionada a partir do grupo que consiste em renina; hormonas de crescimento; fator de libertação da hormona de crescimento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora da tiróide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A da insulina; cadeia B da insulina; proinsulina; hormona estimuladora do folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagon; fatores de coagulação como fator VIIIC, fator IX, fator tecidual; fator de von Willebrands; Proteína C; fator natriurético atrial; surfatante pulmonar; um ativador do plasminogénio (t-PA) do tipo urocinase ou urina humana ou do tipo tecidual; bombesina; trombina, fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase, RANTES; proteína inflamatória de macrófagos humana (MIP-1-alfa); albuminas séricas; substância inibidora Muelleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorelaxina; péptido associado à gonadotropina de ratinho; beta-lactamase; ADNase; IgE; antigénios associados aos linfócitos T citotóxicos (CTLA); inibina; ativina; factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); recetores de hormonas ou fatores de crescimento; Proteína A ou D; fatores reumatóides; fator neurotrófico derivado do osso (BDNF); neurotrofina-3, -4, -5, e -6 (NT-3, NT-4, NT-5, e NT-6), fatores de crescimento nervoso; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF); fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I no cérebro), proteínas de ligação ao fator de

crescimento semelhante à insulina (IGFBP); proteínas CD; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; proteínas morfogenéticas do osso (BMP); interferão-alfa, -beta, e -gama; fatores estimuladores de colónias (CSF); interleucinas IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; recetores de células T; proteínas de superfície da membrana; fator de aceleração de decaimento; antigénios virais; proteínas de transporte; recetores de endereçamento (*homing*); adressinas; proteínas reguladoras; integrinas; antigénios associados a tumores; e seus fragmentos.

22. O método da reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda a etapa de incorporação da proteína isolada numa formulação farmacêutica.

Lisboa, 11 de Agosto de 2015

FIGURA 1

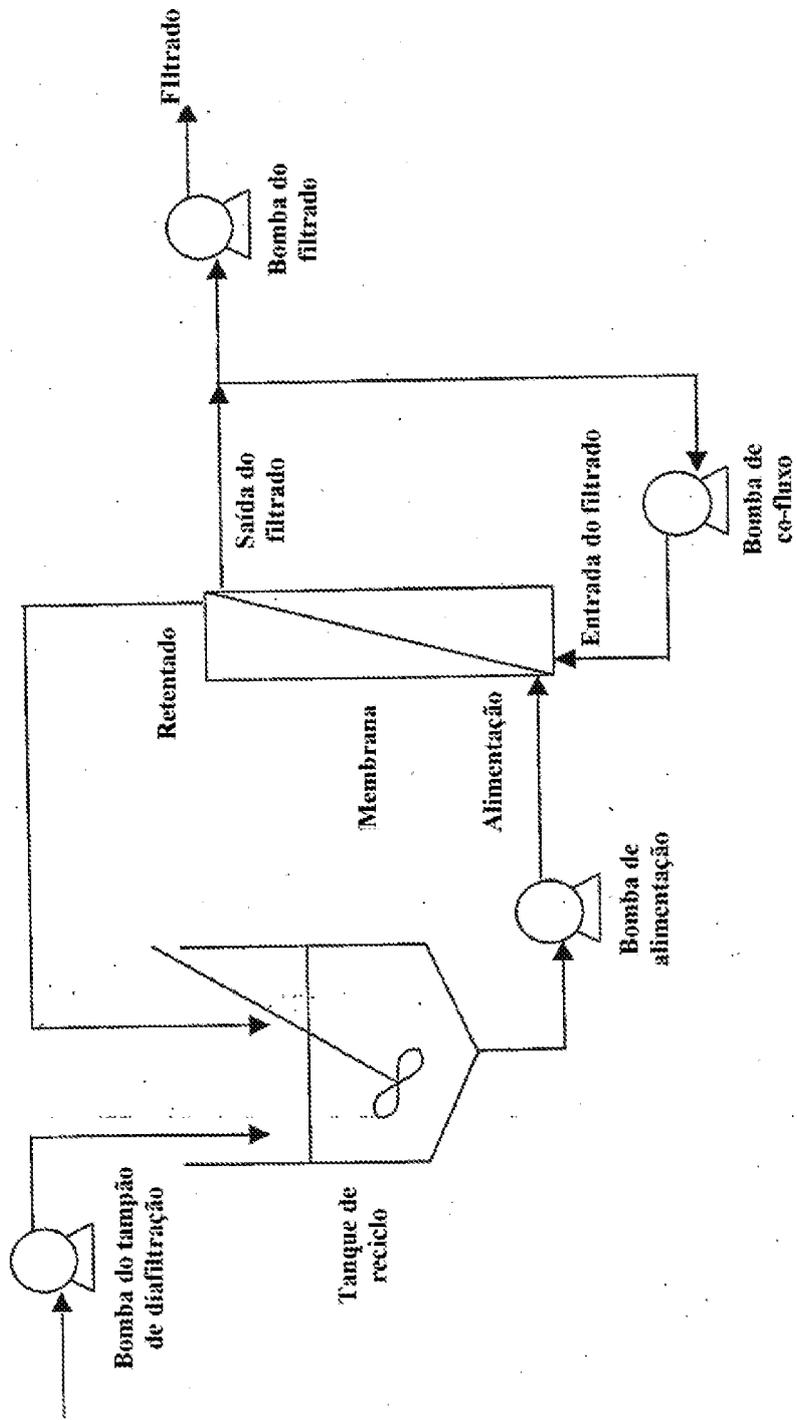


FIGURA 2

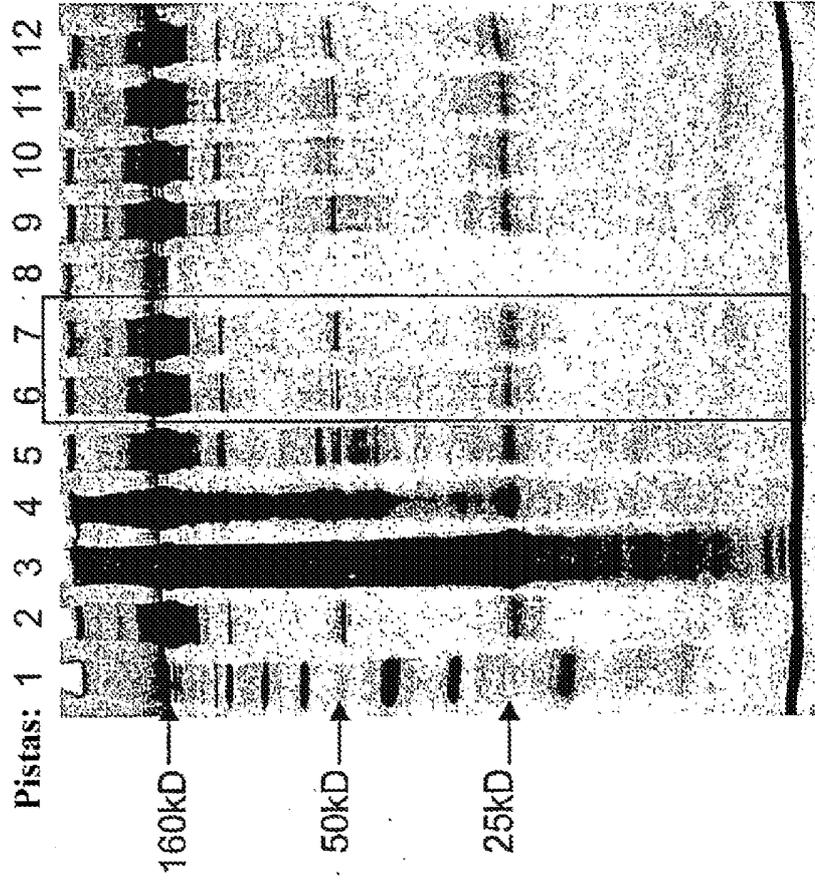


FIGURA 3

Sequências de aminoácidos completas da cadeia pesada e da cadeia leve do rhuMAB anti-HER2:

Figura 3A cadeia leve de anti-HER2 rhuMAB:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg Thr Val Ala
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Gln Ala Lys Val Gln Trp
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Gln Ser Val Thr Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Gln Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Gln Cys (SEQ ID NO:1)

Figura 3B cadeia pesada de anti-HER2 rhuMAB:

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gln Pro Lys
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Gln Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Ile Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
Pro Ala Pro Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gln Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly (SEQ ID NO: 2)

FIGURA 4

Seqüência de aminoccidos da proteína de anticorpo maduro anti-CD11a:

Figura 4A cadeia leve de anti-CD11a rhuMAB:

DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRAASKTISKYLAWYQQKPKGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFS
 GSGGTDFTLTITSSLPQEDFAITYCQQHNEYPLTFGQGTKEIKRIVAAPSVFIFFPSDEQLKS
 GTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLISKADYEEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Figura 4B cadeia pesada de anti-CD11a rhuMAB:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFGHWMNWVRQAPGKGLEWVGMIHPSDSETRY
 NQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIYFYGTTYFDYWGGQTLVTVSS
 ASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALISGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPELGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:4)

FIGURA 5

Qualidade do produto anti-CD40 rhuMab

