

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 397**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2018 PCT/US2018/044891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19028191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2018 E 18759205 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3662288**

54 Título: **Sistemas y métodos para realizar un ensayo de glicanos en tiempo real de una muestra**

30 Prioridad:

01.08.2017 US 201762539798 P

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

11.09.2024

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

WU, CHAO-HSIANG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 397 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas y métodos para realizar un ensayo de glicanos en tiempo real de una muestra

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

5 La presente descripción se refiere en general a ensayos de glicanos y, más específicamente, a realización de un ensayo de glicanos en tiempo real de una muestra.

LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta con una lista de secuencias en formato electrónico. La lista de secuencias se proporciona como un archivo titulado, "51970_Seqlisting.txt" creado el 31 de julio de 2018 con un tamaño de 263,980 bytes.

10 ANTECEDENTES

Los ensayos se realizan comúnmente para cuantificar uno o más atributos de un analito tal como un fármaco, una sustancia bioquímica, o una célula. Un ejemplo de un ensayo de ese tipo es el ensayo del método de múltiples atributos (MAM), que puede detectar y cuantificar Atributos de Calidad Crítica (CQA), identificados por el Perfil de Producto Diana de Calidad (QTPP), de una muestra (Desarrollo de un método de múltiples atributos de espectrometría de masas cuantitativa para la caracterización, pruebas de control de calidad y disposición de productos biológicos. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. *MABs*. 2015; 7(5): 881-90). El ensayo de MAM es un procedimiento operado manualmente que se realiza en, por ejemplo, un laboratorio de Prueba de Liberación de Molécula Grande (LMRT). MAM es un método de cartografiado de péptidos basado en cromatografía de líquidos (CL) - espectrometría de masas (EM), que tiene tres etapas: (1) preparación de la muestra (que puede incluir, por ejemplo, desnaturalización, reducción, alquilación, y digestión de polipéptidos); (2) separación de los polipéptidos digeridos por CL y detección de ellos por EM; y (3) análisis de los datos para CQA seleccionados como diana y detección de nueva señal (*es decir*, picos) cuando se compara con un patrón de referencia. El documento WO 2012/037407 describe métodos para aislar y desglicosilar glicoproteínas.

25 CQA son propiedades químicas, físicas, o biológicas que están presentes dentro de un valor específico o valores de rango. Por ejemplo, para las moléculas terapéuticas de polipéptidos grandes, los atributos físicos y las modificaciones de los aminoácidos (los elementos estructurales de los polipéptidos) son CQA importantes que se monitorizan durante y después de la fabricación, así como durante el desarrollo de fármacos. A diferencia de los ensayos analíticos convencionales que rastrean los cambios en el tamaño de pico y la forma de pico de polipéptidos completos o parciales, MAM detecta CQA específicos a nivel de aminoácidos.

30 El análisis del perfil de glicanos de un producto terapéutico polipeptídico es a menudo un CQA, *por ejemplo*. Esto es especialmente cierto en el caso de los productos biosimilares, en los que el perfil de glicosilación del producto biosimilar debe ser comparable al del producto innovador. Los procedimientos conocidos para realizar ensayos de glicanos requieren que se recoja manualmente una muestra de un producto, se mande a un laboratorio de pruebas, y se concentre manualmente, se purifique, *por ejemplo* y se prepare para el análisis. El tiempo de respuesta típico para estos procedimientos conocidos, operados manualmente, es de aproximadamente cinco días. Este transcurso de tiempo genera costes y retrasos en el desarrollo de fármacos (innovadores y biosimilares) y eventual liberación de fármacos. Por ejemplo, se acumulan retrasos de cinco días durante el desarrollo del fármaco, por ejemplo, cuando se optimiza las condiciones de cultivo para una glicosilación óptima, impidiendo la administración de productos farmacéuticos polipeptídicos nuevos y importantes a los pacientes. Además, tales retrasos dan como resultado perfiles determinados después de la fabricación, dando como resultado productos de re-fabricación que no cumplen con las especificaciones en lugar de ajustar los parámetros de fabricación en tiempo real. Por tanto, existe una necesidad de métodos eficientes y más rápidos para facilitar el análisis de glicanos, incluyendo la preparación de la muestra para tales análisis.

SUMARIO

45 Esta invención se define en las reivindicaciones. Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para preparar una muestra en tiempo real para el análisis de glicanos. El método incluye las etapas de: (a) mover una muestra que comprende polipéptidos a una columna de unión a polipéptidos a través de una bobina de retención; (b) unir los polipéptidos en la muestra a la columna de unión a polipéptidos; (c) mover glicanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos; (d) mover una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, y a través de la columna de unión a polipéptidos, moviendo de ese modo los glicanos liberados fuera de la primera columna de polipéptido; (e) mezclar los glicanos liberados con un reactivo de etiquetado de glicanos aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos; (f) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos a una bobina de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos; (g) incubar la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos en la bobina de reacción, etiquetando de ese modo los glicanos; (h) mover la mezcla a una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción; (i) reducir una temperatura de la mezcla a través de la bobina de enfriamiento; (j) mover la mezcla enfriada a una columna de unión a glicanos

dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento; (k) unir los glicanos marcados a la columna de unión a glicanos; y (l) mover un amortiguador de elución a la columna de unión a glicanos y a través de la columna de unión a glicanos para eluir los glicanos etiquetados unidos a la columna de unión a glicanos.

5 Otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para preparar una muestra en tiempo real para el análisis de glicanos en un sistema cerrado que incluye una válvula de múltiples puertos, una bobina de retención
 10 aguas arriba de la válvula de múltiples puertos, una columna de unión a polipéptidos acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un primer puerto de la válvula de múltiples puertos, una bobina de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, y una
 15 columna de unión a glicanos dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento y acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un segundo puerto de la válvula de múltiples puertos. El método incluye: (a) mover, a través de un controlador acoplado de manera comunicativa al sistema cerrado, una muestra que comprende polipéptidos de un
 20 recipiente que contiene los polipéptidos a la bobina de retención; (b) posicionar, a través del controlador, la válvula de múltiples puertos en una primera posición en la que la bobina de retención se acopla de manera fluida a la columna de unión a polipéptidos a través del primer puerto de la válvula de múltiples puertos, de modo que la muestra fluya a la columna de unión a polipéptidos, por la cual sustancialmente todos los polipéptidos en la muestra se unen a la
 25 primera columna de polipéptidos; (c) cuando la válvula de múltiples puertos está en la primera posición, mover, a través del controlador, glicanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos, y luego mover, a través del controlador, a disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, moviendo
 30 de ese modo los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos; (d) mover, a través del controlador, los glicanos liberados hacia la bobina de reacción; (e) mover, a través del controlador, un reactivo de etiquetado de glicanos hacia los glicanos liberados antes de alcanzar la bobina de reacción, de modo que el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos liberados y las enzimas; (f) mover, a través del controlador, la mezcla a la bobina de reacción, por la cual se etiquetan los glicanos en la mezcla; (g) mover, a través del controlador, la mezcla a una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, reduciendo de ese modo una temperatura de la mezcla; (h) mover, a través del controlador, la mezcla enfriada a una columna de glicano dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento, por la cual sustancialmente todos los glicanos etiquetados se unen a la columna de unión a glicanos; (i) posicionar, a través del controlador, la válvula de múltiples puertos en una segunda posición en la que la columna de unión a glicanos se acopla de manera fluida a una fuente de disolución de amortiguador de elución a través del segundo puerto de la válvula de múltiples puertos; (j) cuando la válvula de múltiples puertos está en la segunda posición, mover, a través del controlador, el amortiguador de elución desde la fuente de amortiguador de elución hasta la columna de unión a glicanos, y a través de la columna de unión a glicanos, por la cual se eluyen los glicanos unidos a la columna de unión a glicanos; y (k) mover, a través del controlador, los glicanos eluidos a un dispositivo de análisis de glicanos.

35 Otro aspecto de la presente descripción proporciona un sistema cerrado para preparar una muestra en tiempo real para el análisis de glicanos. El sistema cerrado incluye una válvula de múltiples puertos, una bobina de retención aguas arriba de la válvula de múltiples puertos, una columna de unión a polipéptidos acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un primer puerto de la válvula de múltiples puertos, una bobina de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, una
 40 columna de unión a glicanos acoplada de manera fluida a y aguas abajo de la bobina de enfriamiento, la columna de unión a glicanos acoplada de manera fluida a la válvula de múltiples puertos a través de un segundo puerto de la válvula de múltiples puertos, y un controlador acoplado de manera comunicativa a la válvula de múltiples puertos. El controlador incluye una memoria, un procesador, y una lógica almacenada en la memoria y ejecutable por el procesador para: (a) mover una muestra de un producto que contiene polipéptidos a la bobina de retención; (b) posicionar la válvula de múltiples puertos en una primera posición en la que la bobina de retención se acopla de manera fluida a la columna de unión a polipéptidos a través del primer puerto de la válvula de múltiples puertos, de modo que la muestra fluya a la primera columna, por la cual sustancialmente todos los polipéptidos en la muestra se unen a la columna de unión a polipéptidos; (c) cuando la válvula de múltiples puertos está en la primera posición, mover glucanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos, y luego mover una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, y a través de la columna de unión a polipéptidos, moviendo de ese modo sustancialmente todos los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos; (d) mover los glicanos liberados hacia la bobina de reacción; (e) mover un reactivo de etiquetado de glicanos hacia los glicanos liberados antes de alcanzar la bobina de reacción, de modo que el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos liberados; (f) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos a la bobina de reacción, por la cual se etiquetan los glicanos en la mezcla; (g) mover la mezcla a una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, en la que la bobina de enfriamiento reduce una temperatura de la mezcla; (h) mover la mezcla a la columna de unión a glicanos, por la cual los glicanos etiquetados se unen a la columna de unión a glicanos; (i) posicionar la válvula de múltiples puertos en una segunda posición en la que la columna de unión a glicanos se acopla de manera fluida a una fuente de disolución de amortiguador de elución a través del segundo puerto de la válvula de múltiples puertos; y (j) cuando la válvula de múltiples puertos está en la segunda posición, mover una disolución de amortiguador de elución desde la fuente de disolución de amortiguador de elución hasta la columna de unión a glicanos, y a través de la columna de unión a glicanos, eluyendo de ese modo glicanos unidos a la columna de unión a glicanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama esquemático de un sistema para realizar un ensayo de glicanos en tiempo real, en línea, ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción.

La figura 2 es un diagrama esquemático de un controlador del sistema ilustrado en la figura 1.

5 Las figuras 3A y 3B son gráficos que representan los resultados de un estudio que monitoriza la eficacia del sistema de la figura 1 en un experimento de producción de 32 días.

La figura 3C es un gráfico que representa un imagen de los resultados de la figura 3A en un periodo de tiempo de cuatro días.

Las figuras 3D y 3E son gráficos adicionales que representan los resultados del estudio.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La figura 1 ilustra un diagrama esquemático de un sistema 100 ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción. El sistema 100, que puede ubicarse a o en un laboratorio (*por ejemplo*, un laboratorio de Prueba de Liberación de Molécula Grande), es un sistema cerrado para preparar automática o de manera sustancial automáticamente una muestra de un producto que contiene polipéptidos para el análisis de glicanos y realizar automáticamente un ensayo de glicanos de esa muestra, tal como se describe en mayor detalle a continuación. Al automatizar (o automatizar sustancialmente) este procedimiento usando el sistema 100, el ensayo puede realizarse en tiempo real (o sustancialmente en tiempo real), de modo que puede realizarse el procedimiento completo, y el resultado deseado obtenido, en un cuestión de horas (*por ejemplo*, de 2 a 3 horas), una mejora significativa a lo largo de los 5 días que normalmente requieren los procedimientos operados manualmente y convencionalmente conocidos. Además, la naturaleza cerrada del procedimiento que utiliza el sistema 100 mantiene condiciones estériles.

En esta versión, los polipéptidos son polipéptidos terapéuticos. Los polipéptidos terapéuticos se discuten a continuación.

El sistema 100 ilustrado en la figura 1 en general incluye una válvula 104 de múltiples puertos, una bobina 108 de retención, una primera columna 112, una bobina 120 de reacción, una segunda columna 124, y un controlador 132. En la versión ilustrada en la figura 1, el sistema 100 también incluye un recipiente 136, una cámara 138 de residuos, una primera bomba 140, una fuente 142 de enzima, una primera fuente 144 de amortiguador, una segunda bomba 146, una segunda fuente 148 de amortiguador, un aparato 150 de vacío, una bobina 152 de enfriamiento, una tercera fuente 154 de amortiguador, una cuarta fuente 156 de amortiguador, una cámara 157 de mezclado, y un dispositivo 158 analítico para analizar los glicanos. En otras versiones, sin embargo, el sistema 100 puede no incluir uno o más de estos componentes. Como un ejemplo, el sistema 100 puede no incluir el recipiente 136, el aparato 150 de vacío, la bobina 152 de enfriamiento, y/o el dispositivo 158 analítico. En cualquier caso, la tubería general convencional se extiende entre cada uno de los componentes del sistema 100 de modo que facilite la comunicación de fluido entre los componentes del sistema 100 cuando se desee, tal como se describe en mayor detalle a continuación.

La válvula 104 de múltiples puertos en general se configura para controlar la comunicación de fluido entre los diversos componentes del sistema 100. En esta versión, la válvula 104 de múltiples puertos es un puerto de doce satélites y una válvula de puerto compartido central. En otras palabras, la válvula 104 de múltiples puertos tiene un puerto 160 central y doce puertos 164-175 de satélite que se acoplan selectivamente de manera fluida al puerto 160 central. La válvula 104 de múltiples puertos puede moverse entre doce posiciones diferentes que acoplan de manera fluida el puerto 160 central con los doce puertos 164-175 de satélite diferentes, respectivamente (algunos de los cuales no se utilizan en la operación del sistema 100 de la figura 1). En otras versiones, la válvula 104 de múltiples puertos puede tener más o menos puertos satelitales, puede ser un tipo diferente de válvula o puede reemplazarse por una o más válvulas diferentes (teniendo cada una uno o más puertos). Como ejemplo, la válvula 104 de múltiples puertos puede reemplazarse por una pluralidad de válvulas de puerto individuales conectadas por separado y controladas por el controlador 132, reemplazando cada una de las válvulas de puerto individuales de manera eficaz uno de los puertos 164-175 satelitales.

El recipiente 136 en general se configura para mantener o almacenar el producto que contiene polipéptidos que tienen glicanos que deben prepararse y analizarse. El recipiente 136 en esta versión toma la forma de un biorreactor que mantiene o almacena el producto. En otras versiones, sin embargo, el recipiente 136 puede en su lugar tomar la forma de un recipiente de cultivo celular, como un matraz, una placa, etc. El recipiente 136 se acopla de manera fluida al puerto 164 satelital de la válvula 104 a través de un conducto 180 de la tubería, de modo que la válvula 104 pueda, cuando se desee, obtener una muestra del producto contenido en el recipiente 136 del recipiente 136.

La bobina 108 de retención se ubica aguas arriba de la válvula 104 y se acopla de manera fluida al puerto 160 central de la válvula 104 a través de un conducto 184 de la tubería. Por tanto, la bobina 108 de retención está dispuesta para recibir la muestra del producto del recipiente 136, a través de la válvula 104, cuando la válvula 104 está en una primera posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 164 satelital.

La primera bomba 140 se ubica aguas arriba de y se acopla de manera fluida a la bobina 108 de retención a través de un conducto 188 de la tubería. La bomba 140 en esta versión toma la forma de una bomba de jeringuilla que se configura en general para ayudar a obtener diversos materiales y ayudar a mover esos materiales a y entre diversos componentes del sistema 100, tal como se describe en mayor detalle a continuación. En otras versiones, la bomba 140 puede ser un tipo diferente de bomba y/o múltiples bombas 140 puede usarse para diferentes materiales y/o para generar materiales a diferentes componentes.

Una válvula 192 se ubica entre la primera bomba 140 y la bobina 108 de retención para acoplar de manera fluida selectivamente la primera bomba 140 a la bobina 108 de retención. Más particularmente, la válvula 192 es móvil entre una primera posición, en la que la bomba 140 se acopla de manera fluida a la bobina 108 de retención, y una segunda posición, en la que la bomba 140 se aísla de manera fluida de la bobina 108 de retención. En otras palabras, la bomba 140 se acopla de manera fluida selectivamente a la bobina 108 de retención dependiendo de la posición de la válvula 192.

Cuando se desea, y cuando la válvula 104 está en la primera posición (en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 164 satelital) y la válvula 192 está en la primera posición, la primera bomba 140 puede facilitar el movimiento de la muestra del producto desde el recipiente 136 hasta la bobina 108 de retención, a través de la válvula 104. La muestra del producto puede a su vez hacerse pasar para la primera columna 112 para la unión.

La primera columna 112 se ubica aguas abajo de la válvula 104 y tiene una entrada acoplada de manera fluida al puerto 165 satelital de la válvula 104 a través de un conducto 196 de la tubería. Por tanto, cuando la válvula 104 está en una segunda posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 165 satelital, la primera bomba 140 puede ayudar a mover (*por ejemplo*, bombear, hacer pasar) la muestra del producto desde la bobina 108 de retención hasta la primera columna 112, a través de la válvula 104. La primera columna 112 tiene una salida que se acopla de manera fluida a una válvula 198 de tres vías configurada para conectar de manera fluida selectivamente la primera columna 112 con la cámara 138 de residuos o bien con la bobina 120 de reacción. Más particularmente, la válvula 198 de tres vías es móvil entre una primera posición, en la que la primera columna 112 se acopla de manera fluida a la cámara 138 de residuos y se aísla de manera fluida del aparato 150 de vacío, y una segunda posición, en la que la primera columna 112 se acopla de manera fluida al aparato 150 de vacío y se aísla de manera fluida de la cámara 138 de residuos. En esta versión, la primera posición de la válvula 198 de tres vías es la posición por defecto, de modo que la válvula 198 de tres vías solo se mueve desde la primera posición hasta la segunda en respuesta al accionamiento de la válvula 198 de tres vías (por ejemplo, por el controlador 132, aplicando una corriente a la válvula 198). En otras versiones, sin embargo, la segunda posición de la válvula 198 de tres vías puede ser la posición por defecto. En cualquier caso, cuando la primera columna 112 recibe la muestra, la primera columna 112 se configura para unir sustancialmente todos los polipéptidos de la muestra a medida que la muestra fluye a través de ella, y la válvula 198 de tres vías está en su primera posición. De esta manera, la primera columna 112 separa sustancialmente los polipéptidos en la muestra de un resto de la muestra, que puede hacerse pasar a la cámara 138 de residuos a través de la válvula 198 de tres vías.

La primera columna 112, que también puede denominarse aquí como una columna de unión a polipéptidos se selecciona de un grupo que consiste en una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G, una columna de proteína L, una columna de aminoácidos, una columna de avidina, una columna de estreptavidina, una columna de unión a hidratos de carbono, una columna de hidratos de carbono, una columna de glutatión, una columna de heparina, una columna de interacción hidrófoba, una columna de inmovilización, una columna de nucleótido/coenzima, una columna de especialidad, y una columna de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Por ejemplo, en el caso de polipéptidos que son IgG humanas de las subclases 1, 2 o 4, IgM, IgA o IgE (y que comprenden una porción Fc humana y/o una región Fab de la familia VH3 humana), son útiles columnas de proteína A. La proteína G puede usarse para purificar las IgG humanas de las subclases 1-4. La proteína de fusión recombinante A/G también puede usarse para purificar todas de estas clases de anticuerpos humanos, ya que la proteína de fusión proporciona sitios de unión de proteína A y proteína G. Por tanto, las proteínas de fusión de la proteína A/G pueden usarse para purificar las IgG, IgA, IgE, e IgM humanas. Además, la proteína L puede usarse para purificar las IgG, IgM, IgA, IgE e IgD humanas, siempre que los anticuerpos diana tengan una cadena ligera de subtipo kappa (κ) apropiada (*es decir*, subtipos V κ I, V κ III y V κ IV); la proteína L también puede usarse para purificar fragmentos Fab y scFv que también tienen el subtipo de cadena κ apropiado, ya que la proteína L se une a la cadena variable (V) de anticuerpos.

Después de que sustancialmente todos los polipéptidos de la muestra estén unidos a la primera columna 112, una disolución que contiene (*por ejemplo*, que consiste en) glucanasas se suministra al sistema 100 por la fuente 142 de enzima, que se acopla de manera fluida al puerto 166 satelital de la válvula 104 a través de un conducto 200 de la tubería. En esta versión, la disolución que contiene las glucanasas se mueve a la bobina 108 de retención, a través de la válvula 104 y con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en una tercera posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 166 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. A su vez, la disolución que contiene las glucanasas se mueve desde la bobina 108 de retención hasta la primera columna 112, a través de la válvula 104 y de nuevo con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en la segunda posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 165 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. En otras versiones, sin embargo, la disolución que contiene las glucanasas pueden proporcionarse a la primera columna 112 de manera diferente (*por ejemplo*, directamente a la primera columna 112,

- sin ayuda de la bomba 140). En cualquier caso, cuando la disolución que contiene las glucanasas alcanza la primera columna 112, las glucanasas en la disolución infunden los polipéptidos unidos a la primera columna 112. La infusión se facilita en general incubando la primera columna 112, que, en esta versión, se logra manteniendo la primera columna 112 a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C, y, más preferiblemente, una temperatura de aproximadamente 37°C. Para este fin, puede conectarse un elemento de calentamiento (*por ejemplo*, una bobina de calentamiento, un calentador de inducción, una bomba de calor, un calentador de cartucho) a la primera columna 112 para proporcionar el calor necesario para mantener la primera columna 112 a la temperatura deseada. En cualquier caso, se aprecia que la infusión de las glucanasas en la disolución sirve para liberar glicanos en los polipéptidos unidos de los polipéptidos unidos en la disolución.
- Las glucanasas en la disolución se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en endoglicosidasas, glicosamidasas, y O-glicanasas, y combinaciones de las mismas. Cuando las glucanasas son o incluyen endoglicosidasas, las endoglicosidasas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en endoglicosidasa D, endoglicosidasa F (endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, y endoglicosidasa F3 y combinaciones de las mismas), endoglicosidasa H, endoglicosidasa S, endoglicosidasa M, y endoglicosidasa B. Cuando las glucanasas son o incluyen glicosamidasas, las glicosamidasas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en glicopeptidasas, péptido N-glicosidasas, PNGasas, N-glicohidrolasas, y N-glicanasas. Cuando las glucanasas son o incluyen PNGasas, las PNGases incluyen preferiblemente péptido:N-glicosidasa F (PNGF). Cuando las glucanasas son o incluyen O-glicanasas, las O-glicanasas preferiblemente son endo-GalNAc-asa D o endoGalNAc-asa A.
- Después de que los glicanos en los polipéptidos unidos se liberan (o se liberan sustancialmente) en la disolución, y con la válvula 198 de tres vías en (o se mueven) a su segunda posición, se coloca una disolución portadora (*por ejemplo*, agua desionizada (DI) se mueve para y a través de la primera columna 112 de modo que se mueve los glicanos liberados (en disolución con las glucanasas) fuera de la primera columna 112. La disolución portadora en general se suministra al sistema 100 por la primera fuente 144 de amortiguador, que se acopla de manera fluida al puerto 167 satelital de la válvula 104 a través de un conducto 204 de la tubería. En esta versión, la disolución portadora se mueve a la bobina 108 de retención, a través de la válvula 104 y con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en una cuarta posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 167 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. A su vez, la disolución portadora se mueve desde la bobina 108 de retención hasta y a través de la primera columna 112, a través de la válvula 104 y de nuevo con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en la segunda posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 165 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. En otras versiones, sin embargo, la disolución portadora puede proporcionarse a la primera columna 112 de manera diferente (*por ejemplo*, directamente a la primera columna 112 y/o sin ayuda de la bomba 140). En cualquier caso, se aprecia que la disolución portadora porte o mueva los glicanos liberados (y las glucanasas) a través y fuera de la primera columna 112.
- La segunda bomba 146 se ubica aguas abajo de la primera columna 112. Como la primera bomba 140, la segunda bomba 146 en esta versión toma la forma de una bomba de jeringuilla que se configura en general para ayudar a obtener diversos materiales y ayudar a mover esos materiales a y entre diversos componentes del sistema 100, tal como se describe en mayor detalle a continuación. En otras versiones, la bomba 146 puede ser un tipo diferente de bomba y/o múltiples bombas 146 puede usarse para diferentes materiales y/o para generar materiales a diferentes componentes.
- Una válvula 208 se ubica entre la segunda bomba 146 y un conducto 212 de la tubería ubicada aguas abajo de la primera columna 112 para acoplar de manera fluida selectivamente la segunda bomba 146 al conducto 212 aguas abajo de la primera columna 112. Más particularmente, la válvula 208 es móvil entre una primera posición, en la que la bomba 140 se acopla de manera fluida a la bobina 108 de retención, y una segunda posición, en la que la bomba 140 se aísla de manera fluida de la bobina 108 de retención. En otras palabras, la bomba 140 se acopla de manera fluida selectivamente a la bobina 108 de retención dependiendo de la posición de la válvula 192.
- La segunda bomba 146 en esta versión también se acopla de manera fluida a la segunda fuente 148 de amortiguador, que se configura para suministrar un reactivo de etiquetado de glicanos tal como, por ejemplo, un fluoróforo (*por ejemplo*, seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-aminobenzoico, sal de disodio del ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico, sal de trisodio del ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico, y antranilamida, 4-metoxibenzamidina) o a cromóforo (*por ejemplo*, 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona o fenilhidrazina). Por tanto, cuando la válvula 208 está en la primera posición, la segunda bomba 146 puede mover (*por ejemplo*, bombear, dirigir) el reactivo de etiquetado de glicanos a través del conducto 212 y hacia los glicanos liberados portados de la primera columna 112 a través de un conducto 216 de la tubería. Por tanto el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos liberados a una posición aguas abajo de la primera columna 112.
- El aparato 150 de vacío se ubica aguas abajo tanto de la primera columna 112 como la segunda bomba 146. El aparato 150 de vacío se acopla de manera fluida tanto al conducto 216 (que porta los glicanos liberados de la primera columna 112) como el conducto 212 (que porta el reactivo de glicano de la segunda bomba 146) a través de un conducto 220 de la tubería. Por tanto el aparato 150 de vacío está dispuesto para recibir la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de glicano. A medida que la mezcla fluye a través del aparato 150 de vacío, el aparato 150 de vacío elimina las burbujas de gas (*por ejemplo*, aire) de la mezcla (es decir, desgasifica la mezcla) que, como se conoce en la

técnica, puede inhibir el rendimiento de los componentes aguas abajo del sistema 100 (por ejemplo, interfiriendo con la entrega de gradiente).

La bobina 120 de reacción se ubica aguas abajo del aparato 150 de vacío (y, por tanto, la primera columna 112 y la segunda bomba 146 también). Una entrada 224 de la bobina 120 de reacción se acopla de manera fluida a una salida 228 del aparato 150 de vacío a través de un conducto 230 de la tubería, de modo que la bobina 120 de reacción está dispuesta para recibir la mezcla incluyendo el reactivo de etiquetado de glicanos y los glicanos liberados. La bobina 120 de reacción, a su vez, en general se configura para facilitar el etiquetado (*por ejemplo*, etiquetado de manera fluorescente) de los glicanos liberados. En general, esto se logra incubando la mezcla en la bobina 120 de reacción. Para este fin, la bobina 120 de reacción se calienta, en esta versión, mediante un elemento 232 de calentamiento conectado a (*por ejemplo*, posicionado inmediatamente adyacente, que rodea) la bobina 120 de reacción. En otras palabras, el elemento 232 de calentamiento puede aplicar calor, preferiblemente calor que tiene una temperatura de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, y, más preferiblemente, calor que tiene una temperatura de aproximadamente 80°C, a la bobina 120 de reacción para fomentar el etiquetado. El elemento 232 de calentamiento puede, por ejemplo, tomar la forma de una bobina de calentamiento, un calentador de inducción, una bomba de calor, un calentador de cartucho, un cable de resistencia eléctrica u otro elemento adecuado para calentar una o más porciones de la bobina 120 de reacción

La bobina 152 de enfriamiento, que en esta versión se prepara de acero inoxidable, se ubica aguas abajo de y se acopla de manera fluida a la bobina 120 de reacción. Más particularmente, una entrada 234 de la bobina 152 de enfriamiento se acopla de manera fluida a una salida 238 de la bobina 120 de reacción a través de un conducto 242 de la tubería, de modo que la bobina 152 de enfriamiento está dispuesta para recibir la mezcla incluyendo el reactivo de etiquetado de glicanos y los glicanos liberados (y ahora etiquetados). La bobina 152 de enfriamiento se mantiene (*por ejemplo*, por el controlador 132) a una temperatura menor que la temperatura en la que se mantiene la bobina 120 de reacción. Por tanto la bobina 152 de enfriamiento no solo reduce la temperatura de la mezcla, sino que también estira la mezcla a medida que fluye a través de ella, reduciendo de ese modo el contenido orgánico de la mezcla. Al hacerlo, la bobina 120 de reacción potencia la capacidad de los glicanos para unirse a la segunda columna.

La segunda columna 124, también denominada aquí como la columna 124 de unión a glicanos, preferiblemente toma la forma de una columna de carbono grafitizado poroso que se ubica aguas abajo de y se acopla de manera fluida a la bobina 152 de enfriamiento a través de un conducto 246. Por tanto la segunda columna 124 está dispuesta para recibir la mezcla enfriada y diluida de la bobina 152 de enfriamiento. Para facilitar el movimiento de la mezcla enfriada y diluida desde la bobina 152 de enfriamiento hasta la segunda columna 124, la segunda bomba 146, cuando la válvula 208 está en la primera posición, puede mover una disolución de amortiguador (*por ejemplo*, formada de acetonitrilo (el 5%) con disolución de TFA al 1%) desde la tercera fuente 154 de amortiguador, que se acopla de manera fluida a la misma hasta la segunda columna 124 a través de los conductos 212, 220, 230, 234, y 246. En cualquier caso, cuando la segunda columna 124 recibe la mezcla de la bobina 152 de enfriamiento, la segunda columna 124 se configura para unir los glicanos etiquetados de la mezcla a medida que la mezcla fluye a través de ella. De esta manera, la segunda columna 124 separa los glicanos etiquetados en la mezcla de un resto de la mezcla, que puede hacerse pasar al residuo (no se muestra).

La segunda columna 124 también se acopla de manera fluida al puerto de satélite 169 de la válvula 104 a través de un conducto 250 de la tubería. En esta versión, el conducto 250 se une o intersecta con el conducto 246 aguas arriba de la segunda columna 124, pero en otras versiones, el conducto 250 puede en su lugar desviar el conducto 246 y conectarse directamente a la segunda columna 124. En cualquier caso, una disolución de amortiguador de elución (*por ejemplo*, formado de acetonitrilo (el 5%) con disolución de TFA al 1%) se mueve a y a través de la segunda columna 124 a través del conducto 250 de modo que eluya sustancialmente todos los glicanos unidos y etiquetados. La disolución de amortiguador de elución en general se suministra por la cuarta fuente 156 de amortiguador, que se acopla de manera fluida al puerto 168 satelital de la válvula 104 a través de un conducto 254 de la tubería. En esta versión, la disolución de elución se mueve desde la cuarta fuente 156 de amortiguador hasta la bobina 108 de retención, a través de la válvula 104 y con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en una quinta posición en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 168 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. A su vez, la disolución de amortiguador de elución se mueve desde la bobina 108 de retención hasta y a través de la segunda columna 124, a través de la válvula 104 y de nuevo con ayuda de la bomba 140, cuando la válvula 104 está en la sexta posición (en la que el puerto 160 central se acopla de manera fluida al puerto 169 satelital y cuando la válvula 192 está en la primera posición. En otras versiones, sin embargo, la disolución de amortiguador de elución puede proporcionarse a la segunda columna 124 de manera diferente (*por ejemplo*, directamente a la segunda columna 124 y/o sin ayuda de la bomba 140). En cualquier caso, la disolución de amortiguador de elución suministrada eluye sustancialmente los glicanos unidos a la segunda columna 124 y porta o mueve los glicanos eluidos a través y fuera de la segunda columna 124.

En esta versión, la disolución de amortiguador de elución porta los glicanos desde la segunda columna 124 hasta la cámara 157 de mezclado, que se ubica aguas abajo de y se acopla de manera fluida a la segunda columna 124 a través de un conducto 258 de la tubería. La mezcla de la disolución de amortiguador de elución y los glicanos fluye a través de la cámara 157 de mezclado, que ayuda a reducir el contenido orgánico de la mezcla y sirve para ajustar el componente de amortiguador de elución de los glicanos para que coincida con una condición inicial de fase móvil

5 cromatográfica. En otras palabras, la cámara 157 de mezclado ayuda a asegurar que la mezcla es representativa de la muestra original obtenida del recipiente 136.

Después de que la mezcla haya estado en la cámara 157 de mezclado durante la cantidad de tiempo predeterminada, la mezcla puede moverse, por ejemplo, usando la disolución de amortiguador de elución, al dispositivo 158 analítico, que puede, por ejemplo, tomar la forma de un dispositivo de cromatografía de líquidos, un dispositivo de cromatografía de líquidos de alta resolución, un dispositivo de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución, un dispositivo de espectrometría de masas, un dispositivo de análisis de glicanos, otro dispositivo de análisis o una combinación de los mismos. En esta versión, el dispositivo 158 analítico se ubica aguas abajo de la segunda columna 124 y se acopla de manera fluida a la segunda columna 124 a través de un conducto 262 de la tubería. Por tanto, en esta versión, la mezcla puede mover automáticamente el dispositivo 158 analítico para análisis de glicanos (*por ejemplo*, para cuantificar y separar los glicanos en la mezcla). En otras versiones, sin embargo, el dispositivo 158 analítico no puede ser parte del sistema 100 (por ejemplo, no se acopla de manera fluida a la tercera columna 128), en cuyo caso la mezcla puede moverse al dispositivo 158 analítico de manera diferente (*por ejemplo*, manualmente).

Como se observó de manera breve anteriormente, el sistema 100 también incluye el controlador 132, que en esta versión se acopla de manera comunicativa o se conecta a diversos componentes del sistema 100 para monitorear y facilitar o dirigir la operación descrita anteriormente del sistema 100 mediante la transmisión de señales (*por ejemplo*, señales de control, datos) a y recepción de señales (*por ejemplo*, datos) de los diversos componentes del sistema 100. El controlador 132 puede ubicarse inmediatamente adyacente a otros componentes del sistema 100 (*por ejemplo*, en el mismo entorno que el sistema 100) o puede ubicarse de manera remota desde los otros componentes del sistema 100. Tal como se ilustra, el controlador 132 se acopla de manera comunicativa o se conecta a la válvula 104 de múltiples puertos a través de una red 300 de comunicación, las bombas 140, 146 primera y segunda a través de redes 320, 324 de comunicación, respectivamente, el dispositivo 158 analítico a través de una red 336 de comunicación, las válvulas 192, 208 a través de redes 340, 344 de comunicación, respectivamente, y el elemento 232 de calor a través de una red de 348 comunicación. En otras versiones, el controlador 132 puede acoplarse de manera comunicativa conectarse a más o menos componentes del sistema 100, *por ejemplo*, la bobina 108 de retención, la primera columna 112, la bobina 120 de reacción, la segunda columna 124, el recipiente 136, la bobina 152 de enfriamiento, la cámara 157 de mezclado, y/o la válvula 198 de tres vías.

Como se usa aquí, las expresiones "acoplado de manera comunicativa" y "conectado" se definen para significar acoplado directamente o conectado a o acoplado indirectamente o conectado a través de uno o más componentes intermedios. Tales componentes intermedios pueden incluir componentes basados en hardware y/o software. Se aprecia que las redes 300-348 pueden ser redes inalámbricas, redes cableadas o combinaciones de una red inalámbrica y cableada (*por ejemplo*, una red de teléfono celular y/o una red compatible con 802.11x), y pueden incluir una red de acceso público, tal como Internet, una red privada o una combinación de las mismas. El tipo y la configuración de las redes 300-348 es de implementación dependiente, y cualquier tipo de redes de comunicaciones que faciliten las comunicaciones descritas entre el controlador 132 y los componentes del sistema 100, disponibles ahora o desarrollados posteriormente, pueden usarse.

Como se muestra en la figura 2, el controlador 132 incluye un procesador 352, una memoria 356, una interfaz 360 de comunicaciones y lógica 364 informática. El procesador 352 puede ser un procesador general, un procesador de señal digital, ASIC, matriz de compuerta programable en campo, unidad de procesamiento de gráficos, circuito analógico, circuito digital o cualquier otro procesador conocido o desarrollado posteriormente. El procesador 352 opera de acuerdo con las instrucciones en la memoria 356. La memoria 356 puede ser una memoria volátil o una memoria no volátil. La memoria 356 puede incluir una o más de una memoria de solo lectura (ROM), memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria flash, un programa borrable electrónico de memoria de solo lectura (EEPROM) u otro tipo de memoria. La memoria 356 puede incluir un dispositivo óptico, magnético (disco duro) o cualquier otra forma de almacenamiento de datos.

La interfaz 360 de comunicaciones se proporciona para permitir o facilitar la comunicación electrónica entre el controlador 132 y los componentes del sistema 100 de refrigeración a través de las redes 300-348. La interfaz 360 de comunicaciones puede ser o incluir, por ejemplo, uno o más puertos de bus universal en serie (USB), uno o más puertos Ethernet, y/o uno o más otros puertos o interfaces. La comunicación electrónica puede producirse a través de cualquier protocolo de comunicación conocido, incluyendo, a modo de ejemplo, USB, RS-232, RS-485, WiFi, Bluetooth, y/o cualquier otro protocolo de comunicación adecuado.

La lógica 364 en general incluye una o más rutinas de control y/o una o más subrutinas incorporadas como instrucciones legibles por ordenador almacenadas en la memoria 356. Las rutinas de control y/o subrutinas pueden realizar PID (relación-integral-derivada), lógica difusa, no lineal o cualquier otro tipo adecuado de control. El procesador 352 en general ejecuta la lógica 364 para realizar acciones relacionadas con la operación del sistema 100.

En general, la lógica 364, cuando se ejecuta, hace que el procesador 352 controle los componentes del sistema 100, particularmente la válvula 104 de múltiples puertos, las bombas 140, 146 primera y segunda, el dispositivo 158 analítico, las válvulas 192, 208 primera y segunda, y el elemento 232 de calentamiento, de modo que el sistema 100 opere de la manera deseada discutida aquí. Más particularmente, la lógica 364, cuando se ejecuta, provoca el procesador 352 para (i) mover la válvula 104 de múltiples puertos a o entre cualquiera de las posiciones descritas

aquí, acoplado de ese modo de manera fluida diversos componentes del sistema 100 tal como se describió anteriormente, (ii) controlar la primera bomba 140 (*por ejemplo*, provocar la bomba 140 para obtener o dirigir materiales tal como se describió anteriormente), (iii) controlar la segunda bomba 146 (*por ejemplo*, provocar la bomba 146 para obtener o dirigir materiales tal como se describió anteriormente), (iv) abrir o cerrar la válvula 192, (v) abrir o cerrar la válvula 208, (vi) controlar el elemento de calentamiento 232 (cuando se emplea) para controlar la temperatura de la bobina 120 de reacción aplicando de manera selectiva calor a la bobina 120 de reacción, y (vii) controlar el dispositivo 158 analítico.

En otras versiones, la lógica 364, cuando se ejecuta por el procesador 352, puede provocar que se realice una funcionalidad adicional, menor y/o diferente. Como un ejemplo, la lógica 364, cuando se ejecuta por el procesador 352, no puede mover los glicanos desde la segunda columna 124 al dispositivo analítico 158 o hacer que el dispositivo analítico 156 realice el análisis deseado. Además, en otras versiones, la lógica 364 puede ejecutarse por el procesador 352 en un orden diferente al descrito aquí. Finalmente, se aprecia que la lógica 364 puede ejecutarse por el procesador 352 cualquier número de veces diferentes, ya que el sistema 100 puede usarse para realizar análisis en tiempo real de múltiples muestras (del mismo producto y/o de un producto diferente).

Las figuras 3A-3E ilustran los resultados de un estudio de perfil de glicosilación en línea y en tiempo real para monitorear la eficacia del sistema 100 en la preparación de una muestra de un polipéptido terapéutico basado en anticuerpos. En particular, el estudio monitoreó la eficacia del sistema 100 en una serie de producción de 32 días. El estudio empezó monitoreando y recogiendo datos de CQA tales como %A1G0F, %A2G0F, %A2G1F (glicanos), y %M5 (manosa 5) en el día cuatro de la serie de producción de 32 días. Tal como se ilustra en las figuras 3A y 3B, el sistema 100 realizó de manera eficaz y efectiva la funcionalidad pretendida discutida aquí durante toda la duración de la serie de producción de 32 días, y tal como se ilustra en las figuras 3D y 3E, los datos de CQA recogidos entre el día cuatro y el día 32 fueron consistentes, *es decir*, no hubo cambios en la calidad del producto a lo largo del tiempo, demostrando la eficacia y robustez del sistema 100. Esto fue a pesar del hecho de que el día 20 de la serie de producción, se interrumpió el flujo de gas oxígeno al recipiente 136 durante dos horas debido a una fuga en el tanque de oxígeno. A su vez, se aumentó la frecuencia de muestreo del recipiente 136 (en este caso desde una vez cada 24 horas hasta una vez cada seis horas) con el fin de monitorear el recipiente 136 a una resolución más alta y evaluar el riesgo de continuar la serie de producción. Sin embargo, tal como se demuestra en las figuras 3A-3C, esta interrupción solo afectó temporalmente algunos de los datos de CQA y los datos de CQA volvieron rápidamente a los valores previos a la interrupción y se estabilizaron. Por consiguiente, se tomó la decisión de continuar la serie de producción.

Polipéptidos terapéuticos

Las proteínas, incluyendo las que se unen a una o más de las siguientes, pueden ser útiles en los dispositivos y métodos dados a conocer. Estos incluyen proteínas CD, incluyendo CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 y CD34; incluyendo aquellos que interfieren con la unión al receptor. Las proteínas de la familia de receptores HER, incluyendo HER2, HER3, HER4 y el receptor EGF. Las moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-1, Mol, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, e integrina alfa v/beta 3. Los factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), hormona del crecimiento, hormona estimulante de la tiroides, hormona estimulante de folículo, hormona luteinizante, factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, sustancia de inhibición de Mullerian, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF), incluyendo, entre otros, TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5, factores de crecimiento similares a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro) y factores osteoinductores. Las insulinas y las proteínas relacionadas con insulina, incluyendo insulina, cadena A de la insulina, cadena B de la insulina, proinsulina, y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina. La coagulación y las proteínas relacionadas con la coagulación, tales como, entre otras, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrands, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores de plasminógeno, tales como urocinasa y activador de plasminógeno tisular ("t-PA"), bombazina, trombina y trombotopoyetina; (vii) otras proteínas sanguíneas y séricas, incluyendo pero no se limitan a albúmina, IgE y antígenos del grupo sanguíneo. Los factores estimuladores de colonias y receptores de los mismos, incluyendo los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF, y receptores de los mismos, tales como el receptor CSF-1 (c-fms). Los receptores y proteínas asociadas al receptor, incluyendo, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor de LDL, receptores de la hormona de crecimiento, receptores de trombotopoyetina ("TPO-R", "c-mpl"), receptores de glucagón, receptores de la interleucina, receptores de interferón, receptores de células T, receptores del factor de células madre, tales como c-Kit, y otros receptores. Los ligandos receptores, incluyendo, por ejemplo, OX40L, el ligando para el receptor OX40. Los factores neurotróficos, incluyendo el factor neurotrófico derivado de los huesos (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6). Cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, y prorelaxina; interferones y receptores de interferón, incluyendo, por ejemplo, interferón- α , - β , y - γ , y sus receptores. Las interleucinas y receptores de interleucina, incluyendo receptores IL-1 a IL-33 y IL-1 a IL-33, tales como el receptor IL-8, entre otros. Antígenos virales, incluyendo un antígeno viral de la envoltura del SIDA. Lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral alfa y -beta, encefalinasa, RANTES (regulado en la activación, normalmente células T expresadas y secretadas), péptido asociado a gonadotropina de ratón, ADNsa, inhibina y activina. Integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de la membrana superficial, factor acelerador de la descomposición (DAF), envoltura del SIDA, proteínas de transporte, receptores de

residencia, adresas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos. Miostatinas, proteínas TALL, incluyendo TALL-I, proteínas amiloides, incluyendo pero sin limitarse a proteínas beta amiloides, linfopoyetinas del estroma tímico ("TSLP"), ligando RANK ("OPGL"), kit c, receptores TNF, incluyendo el receptor TNF Tipo 1, TRAIL-R2, angiopoyetinas y fragmentos o análogos biológicamente activos o variantes de cualquiera de los anteriores.

5 Los polipéptidos y anticuerpos a modo de ejemplo incluyen Activase® (Alteplasa); alirocumab, Aranesp® (Darbepoyetina-alfa), Epogen® (Epoietina alfa, o eritropoyetina); Avonex® (Interferón β-la); Bexxar® (Tositumomab); Betaseron® (Interferón-β); bococizumab (anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 designado como L1L3, véase el documento US8080243); Campath® (Alemtuzumab); Dynepo® (Epoietina delta); Velcade® (bortezomib); MLN0002 (mAb anti-α4β7); MLN1202 (mAb del receptor de quimiocina anti-CCR2); Enbrel® (etanercept); Eprex® (Epoietina alfa); Erbitux® (Cetuximab); evolocumab; Genotropin® (Somatropina); Herceptin® (Trastuzumab); Humatrope® (somatropina [origen de ADN_r] para inyección); Humira® (Adalimumab); Infergen® (Interferón Alfacon-1); Natrecor® (nesiritida); Kineret® (Anakinra), Leukine® (Sargamostim); LymphoCide® (Epratuzumab); Benlysta™ (Belimumab); Metalyse® (Tenecteplasa); Mircera® (metoxipolietilenglicol-epoietina beta); Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicina); Raptiva® (efalizumab); Cimzia® (certolizumab pegol); Soliris™ (Eculizumab); Pexelizumab (complemento anti-C5);
 10 MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (Ranibizumab); Edrecolomab (Panorex®); Trabio® (lerdelimumab); TheraCim hR3 (Nimotuzumab); Omnitarg (Pertuzumab, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (visilizumab); Cantuzumab mertansina (huC242-DMI); NeoRecormon® (Epoietina beta); Neumega® (Oprelvekina); Neulasta® (filgastrim pegilado, G-CSF pegilado, hu-Met-G-CSF pegilado); Neupogen® (Filgrastim); Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3), Procrit® (Epoietina alfa); Remicade® (Infliximab); Reopro® (Abciximab); Actemra® (mAb del receptor anti-IL6), Avastin® (Bevacizumab), HuMax-CD4 (zanolimumab), Rituxan® (Rituximab); Tarceva® (Erlotinib); Roferon-A® (Interferón alfa-2a); Simulect® (Basiliximab); Stelara™ (Ustekinumab); Prexige® (lumiracoxib); Synagis® (Palivizumab); 146B7-CHO (anticuerpo anti-IL15, véase el documento US7153507), Tysabri® (Natalizumab); Valortim® (MDX-1303, mAb del antígeno protector antracis anti-B.); ABthrax™; Vectibix® (Panitumumab); Xolair® (Omalizumab), ETI211 (mAb de anti-MRSA), IL-1 Trap (la porción Fc de IgG1 humana y los dominios extracelulares de ambos componentes del receptor de IL-1 (el receptor tipo I y el receptor de proteína accesorio)), VEGF Trap (dominios Ig de VEGFR1 fundidos en IgG1 Fc), Zenapax® (Daclizumab); Zenapax® (Daclizumab), Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan), Zetia (ezetimibe), Atacept (TACI-Ig), anti-α4β7 mAb (vedolizumab); galiximab (anticuerpo monoclonal anti-CD80), mAb anti-CD23 (lumiliximab); BR2-Fc (proteína de fusión huBR3/huFc, antagonista BAFF soluble); Simponi™ (Golimumab); Mapatumumab (Receptor-1 anti-TRAIL humano mAb); Ocrelizumab (mAb humano anti-CD20); HuMax-EGFR (zalutumumab); M200 (Volociximab, mAb de integrina anti-α5β1); MDX-010 (Ipilimumab, mAb anti-CTLA-4 y VEGFR-1 (IMC-18F1); mAb anti-BR3; toxina A y toxina B de C difficile anti-C mAbs MDX-066 (CDA-I) y MDX-1388)); conjugados anti-CD22 dsFv-PE38 (CAT-3888 y CAT-8015); mAb anti-CD25 (HuMax-TAC); anticuerpos anti-TSLP; anticuerpo anti-receptor de TSLP (US8101182); anticuerpo anti-TSLP designado como A5 (documento US7982016); (mAb anti-CD3 (NI-0401); Adecatumumab (MT201, mAb anti-EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30, SGN-35 (mAb anti-CD30); MDX-1333 (anti-IFNAR); HuMax CD38 (mAb anti-CD38); mAb anti-CD40L; mAb anti-Cripto; anti-CTGF fibrogen en fase I de fibrosis pulmonar idiopática (FG-3019); mAb anti-CTLA4; mAb anti-eotaxinl (CAT-213); mAb anti-FGF8; mAb de anti-gangliósido GD2; anticuerpos anti-esclerostina (véase, el documento US8715663 o US7592429) anticuerpo anti-esclerostina designado como Ab-5 (documento US8715663 o US7592429); mAb de anti-gangliósido GM2; mAb humano anti-GDF-8 (MYO-029); mAb del receptor anti-GM-CSF (CAM-3001);
 30 mAb anti-HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb anti-IFNα); mAb anti-IGFIR; mAb anti-IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb anti-IL12/IL23p40 (Briakinumab); mAb anti-IL-23p19 (LY2525623); mAb anti-IL13 (CAT-354); mAb anti-IL-17 (AIN457); mAb anti-IL2Ra (HuMax-TAC); mAb del receptor anti-IL5; mAb de receptores anti-integrina (MDX-O18, CNTO 95); mAb de colitis ulcerosa anti-IPIO (MDX-1100); anticuerpo anti-LLY; BMS-66513; receptor anti-Manosa/mAb hCGβ (MDX-1307); conjugado dsFv-PE38 anti-mesotelina (CAT-5001); anti-PDImAb (MDX-1 106 (ONO-4538)); anticuerpo anti-PDGFRα (IMC-3G3); mAb anti-TGFβ (GC-1008); mAb humano del receptor-2 anti-TRAIL (HGS-ETR2); mAb anti-TWEAK; mAb anti-VEGFR/Flt-1; mAb anti-ZP3 (HuMax-ZP3); y un anticuerpo monoclonal amiloide-beta que comprende las secuencias, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:6 (documento US7906625).

Los ejemplos de anticuerpos adecuados para los métodos y formulaciones farmacéuticas incluyen los anticuerpos mostrados en la tabla 1. Otros ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen infliximab, bevacizumab, cetuximab,
 50 ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, altinumab, atlizumab, atorolimiumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavituximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilezomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatuzumab, bivatuzumab mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotin, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansine, cantuzumab mertansine, caplacizumab, capromab pendetide, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatuzumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetan, conatumumab, crenezumab, cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, elotuzumab, elsilimumab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab cituxetan, epratuzumab, erenumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicin, gevokizumab, girentuximab,
 60

ES 2 978 397 T3

- glembatumumab vedotin, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansine, infliximab, intetumumab, inolimumab, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lorvotuzumab mertansine, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentan, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pentumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponezumab, priliximab, primumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, siplizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimumab aritox, tenatumomab, tefibazumab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, tezepelumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07, tregalizumab, tucotuzumab celmoleukin, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab mafodotin, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, zolimomab aritox.
- Los anticuerpos también incluyen adalimumab, bevacizumab, blinatumomab, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, erenumab, evolocumab, infliximab, natalizumab, panitumumab, rilotumumab, rituximab, romosozumab, tezepelumab, y trastuzumab, y anticuerpos seleccionados de la tabla 1.

Diana (nombre informal)	Conc. (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Tipo HC (incluyendo alotipos)	Tipo LC	pl	LC SEQ ID NO	HC SEQ ID NO
anti-amiloide	142,2	5,0	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	9,0	1	2
GMCSF (247)	139,7	5,6	IgG2	Kappa	8,7	3	4
CGRPR	136,6	6,3	IgG2	Lambda	8,6	5	6
RANKL	152,7	6,6	IgG2	Kappa	8,6	7	8
Esclerostina (27H6)	145,0	6,7	IgG2	Kappa	6,6	9	10
IL-1R1	153,9	6,7	IgG2	Kappa	7,4	11	12
Miostatina	141,0	6,8	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,7	13	14
B7RP1	137,5	7,7	IgG2	Kappa	7,7	15	16
Amiloide	140,6	8,2	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,7	17	18
GMCSF (3.112)	156,0	8,2	IgG2	Kappa	8,8	19	20
CGRP (32H7)	159,5	8,3	IgG2	Kappa	8,7	21	22
CGRP (3B6.2)	161,1	8,4	IgG2	Lambda	8,6	23	24
PCSK9 (8A3.1)	150,0	9,1	IgG2	Kappa	6,7	25	26
PCSK9 (492)	150,0	9,2	IgG2	Kappa	6,9	27	28
CGRP	155,2	9,6	IgG2	Lambda	8,8	29	30
Hepcidina	147,1	9,9	IgG2	Lambda	7,3	31	32
TNFR p55)	157,0	10,0	IgG2	Kappa	8,2	33	34
OX40L	144,5	10,0	IgG2	Kappa	8,7	35	36

ES 2 978 397 T3

Diana (nombre informal)	Conc. (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Tipo HC (incluyendo alotipos)	Tipo LC	pl	LC SEQ ID NO	HC SEQ ID NO
HGF	155,8	10,6	IgG2	Kappa	8,1	37	38
GMCSF	162,5	11,0	IgG2	Kappa	8,1	39	40
Glucagón R	146,0	12,1	IgG2	Kappa	8,4	41	42
GMCSF (4.381)	144,5	12,1	IgG2	Kappa	8,4	43	44
Esclerostina (13F3)	155,0	12,1	IgG2	Kappa	7,8	45	46
CD-22	143,7	12,2	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	47	48
INFG R	154,2	12,2	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,8	49	50
Ang2	151,5	12,4	IgG2	Kappa	7,4	51	52
TRAILR2	158,3	12,5	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,7	53	54
EGFR	141,7	14,0	IgG2	Kappa	6,8	55	56
IL-4R	145,8	15,2	IgG2	Kappa	8,6	57	58
IL-15	149,0	16,3	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	59	60
IGF1R	159,2	17,3	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,6	61	62
IL-17R	150,9	19,1	IgG2	Kappa	8,6	63	64
Dkk1 (6.37.5)	159,4	19,6	IgG2	Kappa	8,2	65	66
Esclerostina	134,8	20,9	IgG2	Kappa	7,4	67	68
TSLP Dkk1 (11H10)	134,2	21,4	IgG2	Lambda	7,2	69	70
	145,3	22,5	IgG2	Kappa	8,2	71	72
PCSK9	145,2	22,8	IgG2	Lambda	8,1	73	74
GIPR (2G10.006)	150,0	23,0	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,1	75	76
Activina	133,9	29,4	IgG2	Lambda	7,0	77	78
Esclerostina (2B8)	150,0	30,0	IgG2	Lambda	6,7	79	80
Esclerostina	141,4	30,4	IgG2	Kappa	6,8	81	82
c-fms	146,9	32,1	IgG2	Kappa	6,6	83	84
$\alpha 4\beta 7$	154,9	32,7	IgG2	Kappa	6,5	85	86

* Una concentración a modo de ejemplo adecuada para la administración al paciente; ^HC – cadena pesada de anticuerpos; LC – cadena ligera de anticuerpos.

- 5 Basándose en la descripción anterior, debe apreciarse que los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí facilitan la preparación automática (o sustancialmente automática) de una muestra de un producto que contiene polipéptidos para el análisis de glicanos y el rendimiento automático (o sustancialmente automático) de un análisis de glicanos de esa muestra. Por tanto, la preparación y análisis pueden realizarse sustancialmente en tiempo real. En otras palabras, el procedimiento completo puede realizarse mucho más rápido que lo que actualmente permiten los procedimientos convencionales.
- 10 También debe apreciarse que los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí permiten el procedimiento de preparación de la muestra para el análisis de glicanos y el rendimiento del ensayo de glicanos de esa muestra usando el sistema 100 que va a monitorearse fácilmente, que a su vez puede mitigar el riesgo y extender una serie de producción del producto. En particular, este procedimiento puede monitorearse determinando, por ejemplo, usando un controlador tal como el controlador 132 y/o manualmente por un operador del sistema 100, si las condiciones en el

sistema 100 son óptimas, es decir, si satisfacen un umbral de rendimiento predeterminado. Tal como se ilustra en las figuras 3D y 3E, por ejemplo, pueden obtenerse los valores del % de glicosilación para un conjunto de especies de glicosilación (en este caso el % de M5, A1G0F, A2G0F, el % de HM, el % de Fuc, el % de Gal, A2G1F y el % de híbrido) y compararse con los valores históricos para aquellas especies de glicosilación recogidas durante la calificación del método para determinar si las condiciones en el sistema 100 son óptimas, de modo que la serie de producción pueda comenzar, continuar o extenderse. Sin embargo, cuando se determina que las condiciones en el sistema 100 no son óptimas, puede ajustarse al menos un componente de cultivo celular hasta que las condiciones en el sistema cerrado sean óptimas. Los ejemplos de componentes de cultivo celular que pueden ajustarse incluyen, pero no se limitan a: pH, presión, temperatura, flujo de medios (por ejemplo, velocidad de flujo de medios, velocidad de alimentación de medios), contenido de medios (incluyendo aminoácidos, nutrientes, azúcares, amortiguador), estrategia de gasificación (por ejemplo, mezcla de oxígeno y dióxido de carbono, tasa de gas), agitación (por ejemplo, tasa de agitación), aditivos (por ejemplo, aditivos metálicos, aditivos de azúcar), tasa de alimentación de aditivos (por ejemplo, antiespumante) tasa de perfusión. En algunos casos, es posible que solo sea necesario ajustar un componente de cultivo celular para que las condiciones en el sistema cerrado sean óptimas, mientras que en otros casos, es posible que sea necesario ajustar múltiples componentes de cultivo celular. Alternativamente, cuando se determina que las condiciones no son óptimas, o cuando las condiciones en el sistema 100 no son óptimas incluso después de ajustar el al menos un componente de cultivo celular, el controlador y/o el operador del sistema 100 pueden apagarse el sistema 100.

De esta manera, los dispositivos, sistemas, y métodos descritos aquí también mitigan el riesgo implicado en la operación continuada del sistema 100 cuando las condiciones no son óptimas o cuando por otro lado no es deseable continuar la operación del sistema 100. En particular, puede mitigarse el riesgo determinando (*por ejemplo*, calculando o obteniendo) parámetros del procedimiento y datos de calidad del producto, por ejemplo, pH, temperatura, disolución de oxígeno, viabilidad celular, densidad celular, título, agregación, variante de carga, glicosilación, etc., asociados con la operación actual del sistema 100, determinando si el parámetro del procedimiento y los datos de calidad del producto satisfacen un umbral de riesgo predeterminado (determinado antes de la operación del sistema 100 por un controlador tal como el controlador 132 y/o que responde a la entrada del operador del sistema 100), y luego determinando si continúa, cesa, o ajusta la operación del sistema 100 basándose en si el parámetro del procedimiento y los datos de calidad del producto satisfacen el umbral de riesgo predeterminado. El umbral de riesgo predeterminado puede, por ejemplo, determinarse (1) aplicando los datos de parámetros de proceso disponibles y los datos de calidad del producto para calcular los datos históricos promedio de múltiples variables (MV) asociados con la operación previa del sistema 100 o algún otro sistema similar, y luego (2) estableciendo los datos de MV históricos promedio calculados como el umbral (el umbral puede ser los datos de MV históricos promedio calculados o algún valor o conjunto de valores basados en los datos de MV históricos promedio calculados. En un ejemplo, el umbral de riesgo predeterminado puede representar una desviación aceptable (por ejemplo, tres desviaciones estándar) a partir de los datos de VM históricos promedio calculados. Alternativa o adicionalmente, el umbral de riesgo predeterminado puede determinarse basándose en la información del operador del sistema 100. En algunos casos, el sistema 100 puede cerrarse cuando el parámetro del procedimiento y los datos de calidad del producto asociados con la operación actual del sistema 100 no satisfacen (*por ejemplo*, exceden) el umbral de riesgo predeterminado. En otros casos, sin embargo, el sistema 100 puede ajustarse cuando el parámetro del procedimiento y los datos de calidad del producto asociados con la operación actual del sistema 100 no satisfacen el umbral de riesgo predeterminado o incluso cuando el parámetro del procedimiento y los datos de calidad del producto satisfacen pero están cerca del umbral de riesgo predeterminado. Por ejemplo, y tal como se discutió de manera breve anteriormente, puede ajustarse la frecuencia de muestreo del recipiente 136.

Además, el Solicitante ha descubierto que los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí también permiten extender las series de producción usando el sistema 100. Los procedimientos convencionales normalmente permiten 32-40 series de producción diaria, como máximo. Sin embargo, el solicitante ha encontrado que los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí permiten 50-80 si no 100 duplicaciones de población, *es decir*, aproximadamente 50-80 si no 100 series de producción diaria. Por tanto, puede obtenerse más producto, todo mientras que se monitorea la operación del sistema 100 para asegurar que el producto satisfaga los objetivos de calidad y se mitigue el riesgo.

Se describen realizaciones preferidas de la presente descripción aquí, incluyendo la mejor o mejores formas conocidas por los inventores para realizar la descripción. Aunque se muestran y se describen aquí numerosos ejemplos, los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que los detalles de las diversas realizaciones no necesitan ser mutuamente exclusivos. En cambio, los expertos en la técnica tras leer las enseñanzas aquí deberían poder combinar una o más características de una realización con una o más características de las realizaciones restantes. Además, también debe entenderse que las realizaciones ilustradas son solo a modo de ejemplo, y no deben tomarse como limitativas del alcance de la descripción. Todos los métodos descritos en la presente pueden ser llevados a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos o las expresiones de ejemplo (*por ejemplo*, "tal como") aquí pretende meramente iluminar mejor los aspectos de la realización o realizaciones a modo de ejemplo de la descripción y no presentan una limitación al alcance de la descripción. No se debe interpretar ninguna palabra en la memoria descriptiva como una indicación de que algún elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la descripción.

REIVINDICACIONES

1. El método para preparar una muestra en tiempo real para análisis de glicanos, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) mover una muestra que comprende polipéptidos a una columna (112) de unión a polipéptidos a través de una bobina (108) de retención;
- (b) unir polipéptidos en la muestra a la columna de unión a polipéptidos;
- (c) mover glicanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos;
- 10 (d) mover una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, y a través de la columna de unión a polipéptidos, moviendo de ese modo los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos;
- (e) mezclar los glicanos liberados con un reactivo de etiquetado de glicanos aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos;
- 15 (f) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos a una bobina (120) de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos;
- (g) incubar la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos en la bobina de reacción, etiquetando de ese modo los glicanos;
- (h) mover la mezcla a una bobina (152) de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción;
- (i) reducir una temperatura de la mezcla a través de la bobina de enfriamiento;
- 20 (j) mover la mezcla enfriada a una columna (124) de unión a glicanos dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento;
- (k) unir los glicanos marcados a la columna de unión a glicanos; y
- (l) mover un amortiguador de elución a la columna de unión a glicanos y a través de la columna de unión a glicanos para eluir los glicanos etiquetados unidos a la columna de unión a glicanos.
- 25 en el que una o más de (a), (c), (d), (e), (f), (h), (j), y (l) se realizan automáticamente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que (a) a (l) se realizan en un sistema cerrado.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que:
- 30 el método comprende además, después de (e) y antes de (f), mover la mezcla a un aparato (150) de vacío dispuesto aguas abajo de la bobina de enfriamiento y aguas arriba de la columna de unión a glicanos, y, usando el aparato de vacío, eliminar sustancialmente burbujas de gas de la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos; y/o
- el método comprende además, después de (l), mover los glicanos eluidos a través de una cámara (157) de mezclado dispuesta aguas abajo de la columna de unión a glicanos, y ajustar un componente de amortiguador de elución de los glicanos etiquetados para que coincida con una condición inicial de fase móvil cromatográfica; y/o
- 35 (a) comprende mover la muestra desde un recipiente (136) que contiene la muestra hasta la columna de unión a polipéptidos, opcionalmente en el que el recipiente comprende un biorreactor; y/o
- (g) comprende el etiquetado de manera fluorescente de los glicanos con el reactivo de etiquetado de glicanos; y/o
- (g) comprende aplicar calor a la mezcla en la bobina de reacción; y/o
- 40 el método comprende además (m) mover los glicanos eluidos desde la columna de unión a glicanos hasta un dispositivo de análisis de glicanos, opcionalmente en el que el método comprende además (n) separar y cuantificar los glicanos usando el dispositivo de análisis de glicanos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además, mover una válvula (198) acoplada de manera fluida a y ubicada aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos a una primera posición en la que la válvula dirige un resto de la muestra que fluye a través de la columna de unión a polipéptidos a una cámara de residuos.
- 45

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además, antes de (e), mover la válvula a una segunda posición en la que la primera válvula dirige los glicanos liberados desde y fuera de la columna de unión a polipéptidos hacia el reactivo de etiquetado de glicanos.

5 6. Un método para preparar una muestra en tiempo real para el análisis de glicanos en un sistema cerrado que comprende una válvula (104) de múltiples puertos, una bobina (108) de retención aguas arriba de la válvula de múltiples puertos, una columna (112) de unión a polipéptido acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un primer puerto de la válvula de múltiples puertos, una bobina (120) de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptido, una bobina (152) de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, y una columna (124) de unión a glicanos dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento y acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un segundo puerto de la válvula de múltiples puertos, comprendiendo el método:

(a) mover, a través de un controlador (132) acoplado de manera comunicativa al sistema cerrado, una muestra que comprende polipéptidos desde un recipiente que contiene los polipéptidos hasta la bobina de retención;

15 (b) posicionar, a través del controlador, la válvula de múltiples puertos en una primera posición en la que la bobina de retención se acopla de manera fluida a la columna de unión a polipéptidos a través del primer puerto de la válvula de múltiples puertos, de modo que la muestra fluya a la columna de unión a polipéptidos, por la cual sustancialmente todos los polipéptidos en la muestra se unen a la primera columna de polipéptidos;

20 (c) cuando la válvula de múltiples puertos está en la primera posición, mover, a través del controlador, glicanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos, y luego mover, a través del controlador, una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, y a través de la columna de unión a polipéptidos, moviendo de ese modo los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos;

(d) mover, a través del controlador, los glicanos liberados hacia la bobina de reacción;

25 (e) mover, a través del controlador, un reactivo de etiquetado de glicanos hacia los glicanos liberados antes de alcanzar la bobina de reacción, de modo que el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos liberados y las enzimas;

(f) mover, a través del controlador, la mezcla a la bobina de reacción, por la cual se etiquetan los glicanos en la mezcla;

30 (g) mover, a través del controlador, la mezcla a una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, reduciendo de ese modo una temperatura de la mezcla;

(h) mover, a través del controlador, la mezcla enfriada a una columna de glicano dispuesta aguas abajo de la bobina de enfriamiento, por la cual sustancialmente todos los glicanos etiquetados se unen a la columna de unión a glicanos;

35 (i) posicionar, a través del controlador, la válvula de múltiples puertos en una segunda posición en la que la columna de unión a glicanos se acopla de manera fluida a una fuente de disolución de amortiguador de elución a través del segundo puerto de la válvula de múltiples puertos;

(j) cuando la válvula de múltiples puertos está en la segunda posición, mover, a través del controlador, el amortiguador de elución desde la fuente de amortiguador de elución hasta la columna de unión a glicanos, y a través de la columna de unión a glicanos, eluyendo de ese modo glicanos unidos a la columna de unión a glicanos; y

40 (k) mover, a través del controlador, los glicanos eluidos a un dispositivo de análisis de glicanos.

7. El método de la reivindicación 6, en el que:

el método comprende además, después de (e) y antes de (f), mover, a través del controlador, la mezcla a un aparato (150) de vacío dispuesto aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos y aguas arriba de la bobina de reacción, eliminando sustancialmente de ese modo burbujas de gas de la mezcla; y/o

45 el método comprende además, después de (j) y antes de (k), mover, a través del controlador, los glicanos eluidos a través de una cámara (157) de mezclado dispuesta aguas abajo de la columna de unión a glicanos y aguas arriba del dispositivo de análisis de glicanos; y/o

el método comprende además controlar, a través del procesador, la columna de unión a polipéptidos para mantener la columna de unión a polipéptidos a una temperatura de aproximadamente 38 grados Celsius; y/o

50 el método comprende además controlar, a través del procesador, la bobina de reacción para mantener la bobina de reacción a una temperatura de aproximadamente 80 grados Celsius; y/o

(f) comprende mover, a través del controlador, la mezcla a la bobina de reacción, por la cual los glicanos en la mezcla se etiquetan de manera fluorescente.

8. Un sistema cerrado para preparar una muestra en tiempo real para análisis de glicanos, comprendiendo el sistema cerrado:

- 5 un recipiente (136) adaptado para contener polipéptidos;
- una bobina (108) de retención acoplada de manera fluida al biorreactor y dispuesta para recibir una muestra de los polipéptidos del biorreactor;
- una válvula (104) de múltiples puertos acoplada de manera fluida a y ubicada aguas abajo de la bobina de retención;
- 10 una columna (112) de unión a polipéptidos acoplada de manera fluida a la válvula de múltiples puertos y dispuesta para recibir la muestra de la bobina de retención a través de un primer puerto de la válvula de múltiples puertos;
- una fuente de glucanasa acoplada de manera fluida a la válvula de múltiples puertos y dispuesta para suministrar glucanasas a la columna de unión a polipéptidos, de modo que las glucanasas se infunden con los polipéptidos unidos a la columna de unión a polipéptidos;
- 15 una fuente de disolución portadora acoplada de manera fluida a la válvula de múltiples puertos y dispuesta para suministrar una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, en el que la disolución portadora se adapta para liberar y portar los glicanos de la columna de unión a polipéptidos;
- una primera bomba (140) dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos para dirigir un reactivo de etiquetado de glicanos hacia los glicanos liberados portados de la columna de unión a polipéptidos, de modo que
- 20 el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos;
- una bobina (120) de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos y la primera bomba, la bobina de reacción adaptada para recibir la mezcla que comprende el reactivo de etiquetado de glicanos y los glicanos liberados y para permitir el etiquetado de los glicanos liberados;
- 25 una bobina (152) de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción y adaptada para recibir la mezcla de la bobina de reacción, la bobina de enfriamiento configurada para reducir una temperatura de la mezcla;
- una columna (124) de unión a glicanos acoplada de manera fluida a la bobina de enfriamiento y a la válvula de múltiples puertos a través de un segundo puerto de la válvula de múltiples puertos, la columna de unión a glicanos configurada para unir sustancialmente todos los glicanos etiquetados, la columna de unión a glicanos adaptada para recibir una disolución de amortiguador de elución a través del segundo puerto de la válvula de múltiples
- 30 puertos, en el que la disolución de amortiguador de elución eluye los glicanos etiquetados unidos y porta los glicanos eluidos etiquetados a un dispositivo de análisis de glicanos aguas abajo de la columna de unión a glicanos.

9. El sistema de la reivindicación 8, en el que:

- el recipiente comprende un biorreactor; y/o
- 35 el sistema comprende además un aparato (150) de vacío dispuesto aguas arriba de la bobina de reacción y aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos y la primera bomba, el aparato de vacío configurado para eliminar sustancialmente burbujas de gas de la mezcla que comprende el reactivo de etiquetado de glicanos y los glicanos liberados; y/o
- 40 el sistema comprende además una cámara (157) de mezclado dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos y aguas arriba de la bobina de reacción, en la que la cámara de mezclado facilita un ajuste de un componente de amortiguador de elución de los glicanos etiquetados para que coincida con una condición inicial de fase móvil cromatográfica; y/o
- la válvula de múltiples puertos comprende una válvula de 12 puertos satelitales y un puerto central compartido; y/o
- 45 la columna de unión a polipéptidos se selecciona del grupo que consiste en una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G, una columna de proteína L, una columna de aminoácidos, una columna de avidina, una columna de estreptavidina, una columna de unión a hidratos de carbono, una columna de hidratos de carbono, una columna de glutatión, una columna de heparina, una columna de interacción hidrófoba, una columna de inmunoafinidad, una columna de nucleótido/coenzima, una columna de especialidad, y una columna de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC); y/o
- 50 en el que las glucanasas se seleccionan del grupo que consiste en endoglicosidasas, glicosamidasas, y O-glicanasas, y combinaciones de las mismas,

opcionalmente en el que:

las endoglicosidasas se seleccionan del grupo que consiste en endoglicosidasa D, endoglicosidasa F (endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, y endoglicosidasa F3 y combinaciones de las mismas), endoglicosidasa H, endoglicosidasa S, endoglicosidasa M, y endoglicosidasa B; o

5 las glicosamidasas se seleccionan del grupo que consiste en glicopeptidasas, péptido N-glicosidasas, PNGasas, N-glicohidrolasas, y N-glicanasas; o

las O-glicanasas son endo-GalNAc-asa D o endoGalNAc-asa A;

y/o el que el reactivo de etiquetado de glicanos es un fluoróforo o un cromóforo.

10 10. El sistema de la reivindicación 9, en el que las glicosamidasas se seleccionan del grupo que consiste en glicopeptidasas, péptido N-glicosidasas, PNGasas, N-glicohidrolasas, y N-glicanasas, y las PNGasas es péptido: N-glicosidasa F (PNGF).

15 11. El sistema de la reivindicación 9, en el que el reactivo de etiquetado de glicanos es un fluoróforo o un cromóforo y el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-aminobenzoico, sal disódica del ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico, sal trisódica del ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico, y antranilamida, 4-metoxibenzamida; opcionalmente en el que el cromóforo comprende 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona o fenilhidrazina.

12. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la columna de unión a glicanos es una columna de carbono grafitizado poroso.

13. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende además:

20 una segunda bomba (146) dispuesta aguas arriba de la válvula de múltiples puertos para bombear la muestra de los polipéptidos desde el recipiente hasta la bobina de retención; y/o

un controlador (132) acoplado de manera comunicativa a la válvula de múltiples puertos, el controlador configurado para abrir y cerrar de manera selectiva los puertos primero y segundo de la válvula de múltiples puertos; y/o

25 un elemento (232) de calentamiento posicionado inmediatamente adyacente a la bobina de reacción, el elemento de calentamiento configurado para mantener la bobina de reacción a una temperatura de aproximadamente 80 grados Celsius.

14. Un sistema cerrado para preparar una muestra en tiempo real para análisis de glicanos, comprendiendo el sistema cerrado:

una válvula (104) de múltiples puertos;

una bobina (108) de retención aguas arriba de la válvula de múltiples puertos;

30 una columna (112) de unión a polipéptidos acoplada de manera fluida a y aguas abajo de un primer puerto de la válvula de múltiples puertos;

una bobina (120) de reacción dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos;

una bobina (152) de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción;

35 una columna (124) de unión a glicanos acoplada de manera fluida a y aguas abajo de la bobina de enfriamiento, la columna de unión a glicanos acoplada de manera fluida a la válvula de múltiples puertos a través de un segundo puerto de la válvula de múltiples puertos; y

un controlador (132) acoplado de manera comunicativa a la válvula de múltiples puertos y que comprende una memoria, un procesador, y una lógica almacenada en la memoria y ejecutable por el procesador para:

(a) mover una muestra de un producto que contiene polipéptidos a la bobina de retención;

40 (b) posicionar la válvula de múltiples puertos en una primera posición en la que la bobina de retención se acopla de manera fluida a la columna de unión a polipéptidos a través del primer puerto de la válvula de múltiples puertos, de modo que la muestra fluya a la primera columna, por la cual sustancialmente todos los polipéptidos en la muestra se unen a la columna de unión a polipéptidos;

45 (c) cuando la válvula de múltiples puertos está en la primera posición, mover glucanasas a la columna de unión a polipéptidos a través de la bobina de retención para liberar glicanos de los polipéptidos unidos, y luego mover una disolución portadora a la columna de unión a polipéptidos, a través de la bobina de retención, y a través de la columna de unión a polipéptidos, moviendo de ese modo sustancialmente todos los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos;

(d) mover los glicanos liberados hacia la bobina de reacción;

(e) mover un reactivo de etiquetado de glicanos hacia los glicanos liberados antes de alcanzar la bobina de reacción, de modo que el reactivo de etiquetado de glicanos se mezcla con los glicanos liberados;

5 (f) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo de etiquetado de glicanos a la bobina de reacción, por la cual se etiquetan los glicanos en la mezcla;

(g) mover la mezcla a una bobina de enfriamiento dispuesta aguas abajo de la bobina de reacción, por la cual la bobina de enfriamiento reduce una temperatura de la mezcla;

(h) mover la mezcla a la columna de unión a glicanos, por la cual los glicanos etiquetados se unen a la columna de unión a glicanos;

10 (i) posicionar la válvula de múltiples puertos en una segunda posición en la que la columna de unión a glicanos se acopla de manera fluida a una fuente de disolución de amortiguador de elución a través del segundo puerto de la válvula de múltiples puertos; y

15 (j) cuando la válvula de múltiples puertos está en la segunda posición, mover una disolución de amortiguador de elución desde la fuente de disolución de amortiguador de elución hasta la columna de unión a glicanos, y a través de la columna de unión a glicanos, eluyendo de ese modo glicanos unidos a la columna de unión a glicanos.

15. El método o sistema de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido es un polipéptido terapéutico y se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y un polipéptido de fusión;

20 opcionalmente en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en infliximab, bevacizumab, ranibizumab, cetuximab, ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, altinumab, atlizumab, atorolimumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavituximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatumab, bivatumab mertansine, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotin, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansin, cantuzumab mertansin, caplacizumab, capromab pendetide, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetan, conatumumab, crenezumab, cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecromeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, elotuzumab, elsilimumab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enokizumab, enoticumab, enoticumab, ensituximab, epritumomab cituxetan, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, exbivirumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimumab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicin, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab vedotin, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansine, infliximab, intetumumab, inolimumab, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lorvotuzumab mertansine, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimumab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentan, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacumab, parsatumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pemtumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponezumab, priliximab, primumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, sipilizumab, sirukumab, solanezumab, solitumab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimumab aritox, tenatumomab, tefibazumab, tefibazumab, telimumab aritox, tenatumomab, tenelimumab, teplizumab, teprotumumab, tezepelumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab, tildrakizumab, tigatumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07, tregalizumab, tremelimumab, tucozumab celmoleukin, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab

5 mafodotin, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, zolimomab aritox, y los anticuerpos mostrados en la tabla 1; o en el que el polipéptido terapéutico es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una glicoproteína, polipéptido CD, un polipéptido del receptor HER, un polipéptido de adhesión celular, un polipéptido del factor de crecimiento, un polipéptido de insulina, un polipéptido relacionado con insulina, un polipéptido de coagulación, un polipéptido relacionado con coagulación, albúmina, IgE, un antígeno del grupo sanguíneo, un factor estimulante de colonias, un receptor, un factor neurotrófico, un interferón, una interleucina, un antígeno viral, una lipoproteína, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalinasa, péptido asociado a gonadotropina de ratón, ADNsa, inhibina, activina, una integrina, proteína A, proteína D, un factor reumatoide, una inmunotoxina, una proteína morfogenética ósea, una superóxido dismutasa, un polipéptido de membrana superficial, un factor de aceleración de la descomposición, una envuelta del SIDA, un polipéptido de transporte, un receptor de residencia, una adresina, un polipéptido regulador, una inmunoadesina, a miostatina, un polipéptido TALL, un polipéptido amiloide, una linfopoyetina del estroma tímico, un ligando RANK, un polipéptido c-kit, un receptor del TNF, y una angiopoyetina, y fragmentos biológicamente activos, análogos o variantes de los mismos.

15

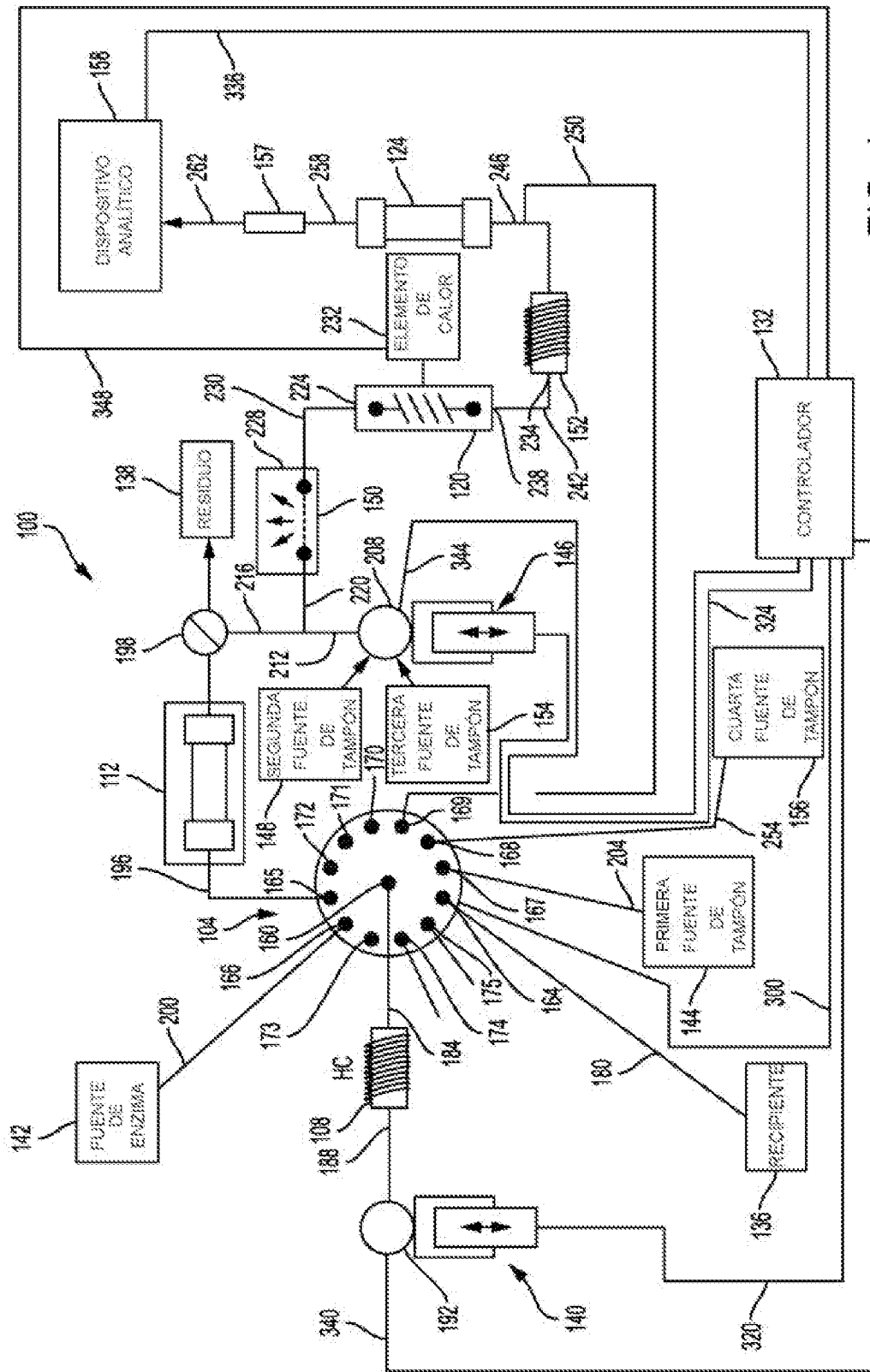


FIG. 1

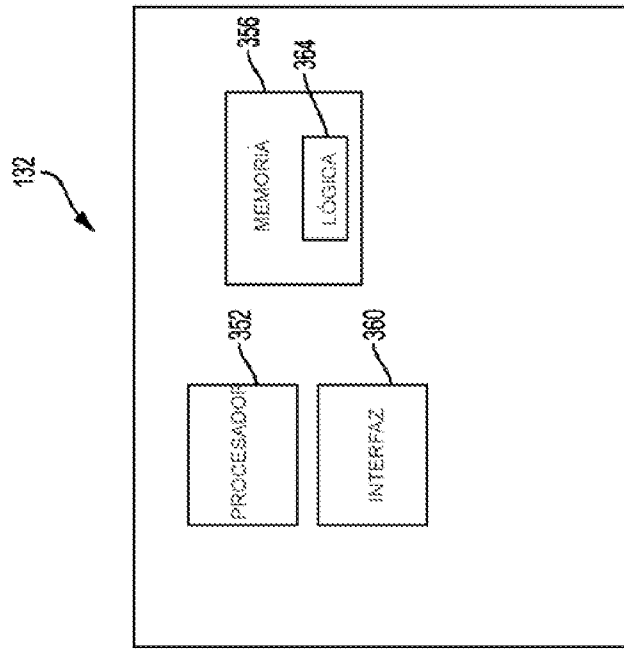


FIG. 2

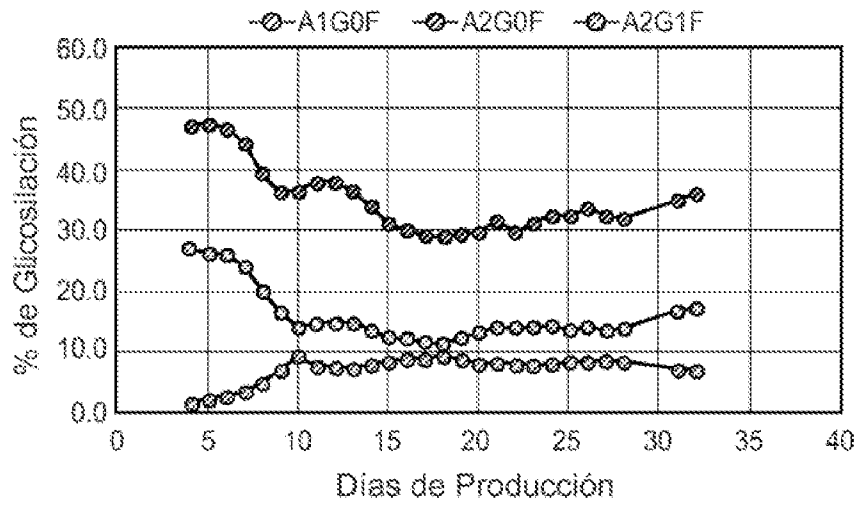


FIG. 3A

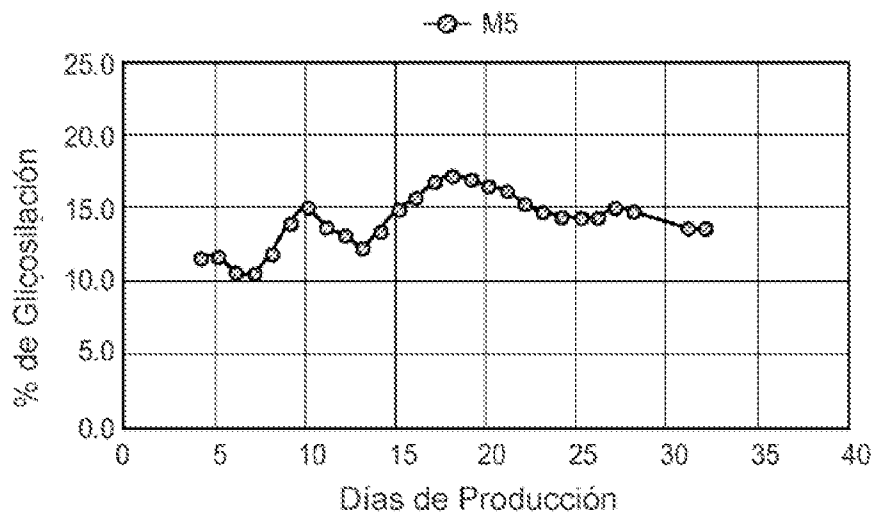


FIG. 3B

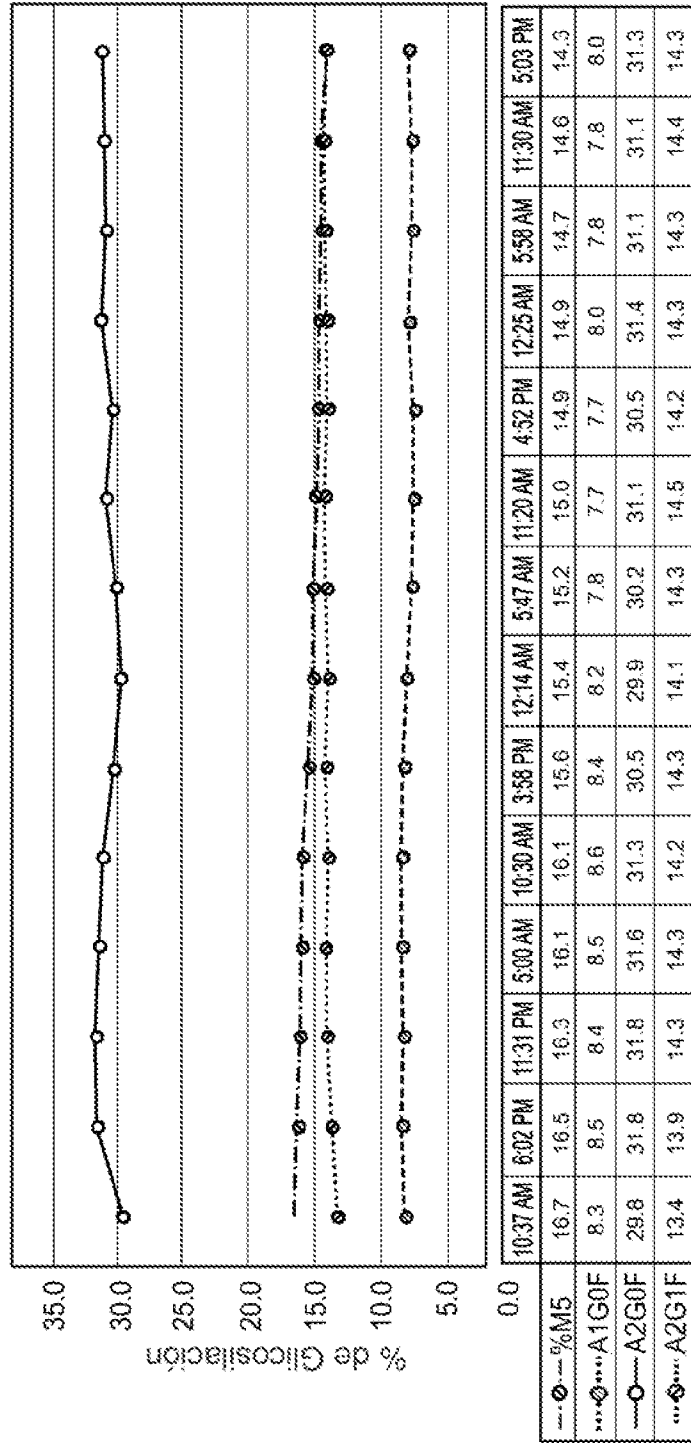


FIG. 3C

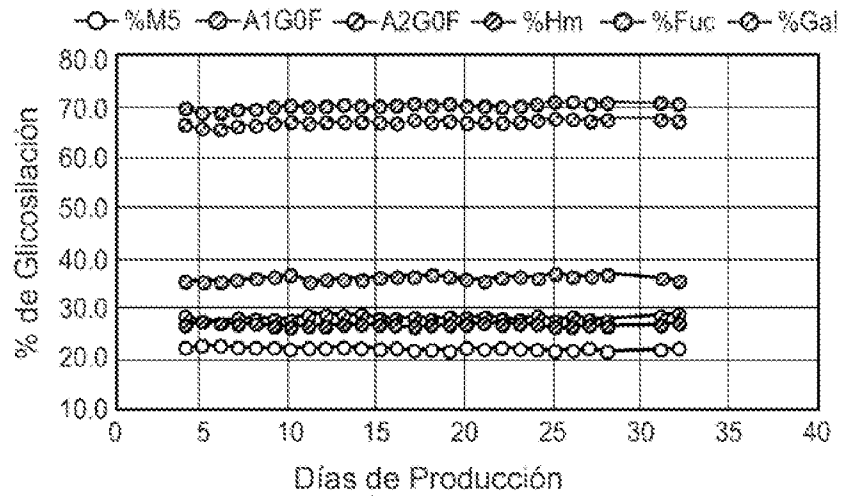


FIG. 3D

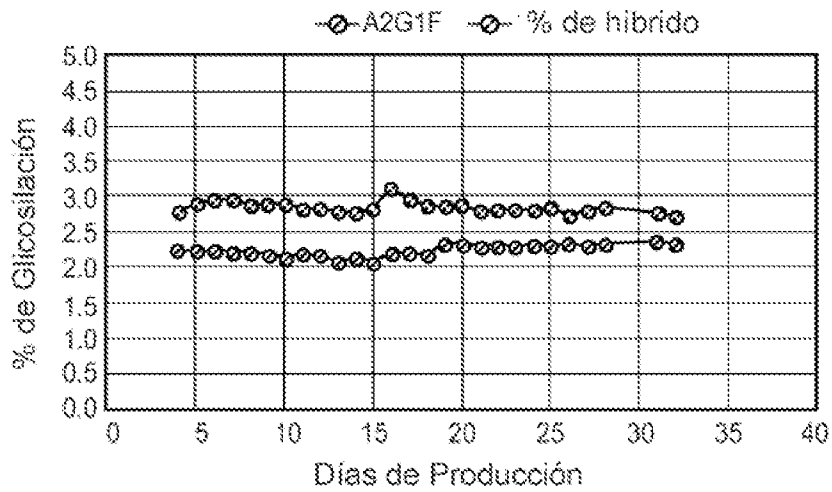


FIG. 3E